

水杨酸在紫杉醇生物合成中诱导作用的研究

苗志奇 未作君 元英进*

(天津大学生化工程系 天津 300072)

摘 要 研究了水杨酸对红豆杉细胞培养中紫杉烷合成的影响。在适宜浓度的水杨酸诱导下,紫杉醇(Taxol)的产量提高了近 3 倍,同时 10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ(10-DAB)与巴卡亭Ⅲ(Baccatin Ⅲ)相应上升。通过对紫杉醇合成代谢途径的动力学分析,初步推断水杨酸的加入提高了 10-DAB 合成速率。并通过水杨酸和硝酸银的配伍诱导,实现了诱导子之间的协同作用,获得了 39 mg/L 的紫杉醇含量,比两个诱导子单独作用时的最高含量之和还高出 50%。

关键词 诱导作用,紫杉醇,水杨酸,作用位点,植物细胞培养

中图分类号 Q813.5 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0509-05

水杨酸作为一种重要的细胞信使与植物抗毒素,可以诱导呼吸方式从细胞色素呼吸途径到交替呼吸途径的转变,为植物病理反应提供物质、能量以及信号传导的基础。外源水杨酸可以诱导烟草中病原相关蛋白基因的表达,诱导防御反应^[1]。若红豆杉细胞培养时加入水杨酸,可能和花生四烯酸、甲基茉莉酮酸等^[2~7]一样诱导紫杉醇^[8]的大量合成。虽然诱导子促进紫杉醇大量合成的功能得到了实验验证,但由于紫杉醇生物合成涉及到的酶数量巨大,且大多数酶目前还不明确,也没有成熟的分离鉴定方法。因此难以通过酶学检测的方法来确定紫杉醇合成途径中那些酶的活性由于诱导而发生改变。

本实验室研究发现不同诱导子可以导致紫杉烷类物质不同的谱分布^[9],表现为诱导子对紫杉烷类物质的诱导选择性,该诱导选择性是区分不同诱导子作用的一个重要指标。是诱导子在紫杉醇生物合成途径上作用部位的直接体现。

本文尝试将水杨酸应用于红豆杉细胞培养体系,考察不同浓度的水杨酸对紫杉烷产量的影响。在最优浓度下研究其对紫杉烷类物质的诱导选择性。通过紫杉醇生物合成途径的动力学定性分析,归纳诱导子的不同作用位点与其对紫杉烷类物质诱导选择性间的对应关系,初步确定水杨酸在紫杉醇生物合成途径上的作用位点。并以此为基础进行多诱导子协同配伍实验,以获得高的紫杉醇含量,同时为作用位点猜测提供间接验证。

1 材料与方法

1.1 细胞株系

实验中所采用细胞为中国科学院植物研究所提供的南方红豆杉(*Taxus Chinese var. Mairei*)YHL 细胞株系。

1.2 培养基

培养基采用含蔗糖 20 g/L 的改良 B5 培养基。培养基 pH 值在灭菌前调整到 5.8。

1.3 诱导子实验设计

实验采用 250 mL 的锥形瓶摇床培养,转速定为 100 r/min。每瓶盛 40 mL 实验用培养基,接入 3 g(以湿重计)混合均匀的种子细胞。实验用培养基的配置方法为在原 B5 培养基中加入水杨酸。为保证实验结果的有效性,每个实验都采用三个平行组。培养第 6 天、10 天后分别取样,检测细胞的生长量与紫杉烷含量。实验中水杨酸浓度如下表所示:

表 1 水杨酸诱导实验设计

Table 1 The designing table of elicitation experiment by salicylic acid

SN of experiment	Concentration of salicylic acid/(mg·L ⁻¹)
A	0
B	0.1
C	1
D	10

收稿日期:1999-08-30 修回日期:2000-03-10。

基金项目:教育部“跨世纪优秀人才培养计划”基金和天津市科委(963107211)项目资助。

* 通讯联系人。

1.4 细胞干湿重测量和紫杉烷的提取与检测方法均参照文献 [6]

2 实验结果分析

考虑到实验中各紫杉烷类物质含量相差很大,采用诱导选择性指数来表征短期诱导实验中水杨酸诱导下紫杉醇谱分布的变化。诱导选择性指数定义如下:若紫杉烷类物质 A 在诱导实验中含量为 $c_A^{\text{实验}}$, 在对照组中含量为 $c_A^{\text{对照}}$, 那么 A 的诱导选择性指数可以用下式来定义: $\eta_A = c_A^{\text{实验}} / c_A^{\text{对照}}$ 。当 η_A 大于 1 时, 表示由于诱导作用物质 A 含量比对照组上升。当 η_A 小于 1 时, 表示由于诱导作用物质 A 比对照组含量下降。

第 6 天时各实验组中紫杉烷类物质的诱导选择性指数, 如图 1 所示。由于本细胞株系的特殊性, 无论实验组还是对照组中 Cephalomannine 的含量都非常低, 因此其含量测量的相对误差非常大, 所以 Cephalomannine 的诱导选择性指数不作为确定水杨酸诱导下紫杉烷谱分布变化的指标。实验编号对应水杨酸浓度如表 1。

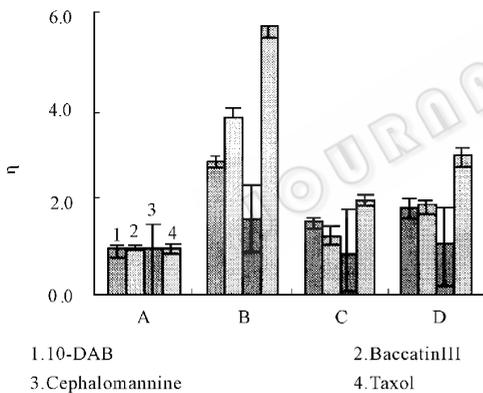


图 1 不同浓度水杨酸诱导下第 6 天紫杉烷谱分布变化

Fig. 1 The change of taxoid concentration induced by salicylic acid at different amount at 6 day

从图 1 中可以看出, 水杨酸加入第 6 天后, 紫杉烷类物质的含量与对照组相比已经出现明显变化, 因此水杨酸在红豆杉细胞培养生产紫杉醇体系中对紫杉醇的诱导延迟小于 6 d。当水杨酸浓度等于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 紫杉醇含量最高, 从对照组的 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高到实验组的 $6.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 比对照组高出近 5.7 倍。当水杨酸的浓度大于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 随着水杨酸浓度的提高, 紫杉醇含量出现下降。

水杨酸诱导后第 10 天的紫杉烷含量的变化如图 2 所示。从中可以看出紫杉醇的最高含量也是出

现在水杨酸浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 第 10 天时实验组中紫杉醇含量近似等于对照组的 4.3 倍, 从对照组的 $3.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高到实验组的 $13.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在更高浓度的水杨酸, 各紫杉烷类物质的含量都出现下降。

细胞的生长曲线(图 3)显示随水杨酸浓度的增加, 其细胞毒性逐渐增强, 细胞的生长量显著下降。水杨酸诱导下紫杉醇含量的影响可以从两个方面来

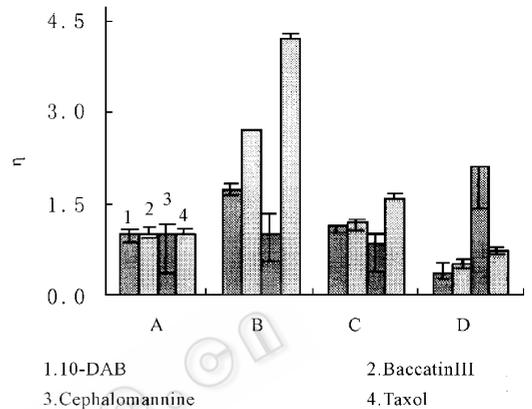


图 2 不同浓度水杨酸诱导下第 10 天紫杉烷谱分布变化

Fig. 2 The change of taxoid concentration induced by salicylic acid at different amount at 10 day

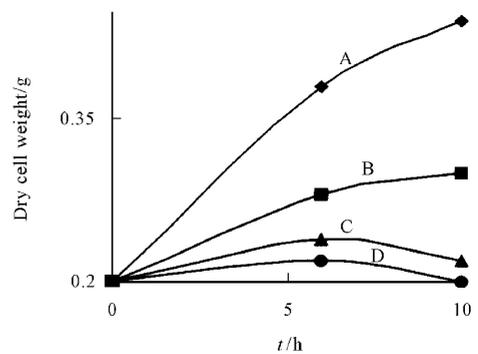


图 3 水杨酸诱导下细胞生长曲线

Fig. 3 The dry cell growth curve at different concentration of salicylic acid

考虑, 一是水杨酸的加入, 可提高紫杉醇合成代谢中某些酶的活力, 进而提高紫杉醇的合成速率; 另一方面, 水杨酸加入导致细胞活力下降, 甚至细胞死亡, 细胞活力过低导致紫杉醇合成速率下降。实验中的紫杉醇含量应是以上两种因素交互作用的结果。

当水杨酸大于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 细胞活性下降对紫杉醇合成的不利影响逐渐增强, 超过水杨酸诱导对紫杉醇合成的促进作用, 导致紫杉醇、Baccatin III、10-DAB 含量的下降。

另外,从图 1、2 可以看出,在 0.1 mg/L 水杨酸诱导下,细胞培养体系中 10-DAB 和 Baccatin III 以及紫杉醇的含量都比对照组明显上升。考虑到 10-DAB 和 Baccatin III 是紫杉醇合成途径中的中间代谢产物,因此 10-DAB 和 Baccatin III 含量的上升可能是紫杉醇含量提高的原因。

3 水杨酸在紫杉醇合成途径上的作用位点推测

根据紫杉醇生物合成途径研究结果^[7-9],10-DAB、Baccatin III、Cephalomannine 与紫杉醇在该途径中的位置如图所示,其中 Y 表示 Cephalomannine 的分解产物,X 表示紫杉醇的降解产物与键合物。

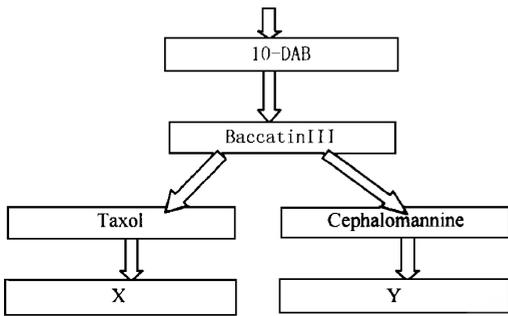


图 4 紫杉醇生物合成途径拓扑简图

Fig. 4 The simplified topological figure of taxol biosynthesis pathway

对紫杉醇合成体系进行物料衡算,可得 10-DAB、Baccatin III、Cephalomannine 和紫杉醇的浓度表达式:

$$c = c^0 + \int_0^t (R_{\text{synthesis}} - R_{\text{consume}}) dt \quad (1)$$

用 R_M 表示紫杉醇物质 M 的生成速率, ΔC_M 表示 M 在诱导实验与对照实验中的含量变化。各紫杉醇类物质在实验组与对照组中含量的变化可以表示如下:

$$\begin{aligned} \Delta C_{10\text{DAB}} &= [c_{10\text{DAB}}^0 + \int_0^t (R_{10\text{DAB}} - R_{\text{Baccat}}) dt]_{\text{诱导组}} \\ &\quad - [c_{10\text{DAB}}^0 + \int_0^t (R_{10\text{DAB}} - R_{\text{Baccat}}) dt]_{\text{对照组}} \\ &= \int_0^t [(R_{10\text{DAB}} - R_{\text{Baccat}})_{\text{诱导组}} - (R_{10\text{DAB}} - \\ &\quad R_{\text{Baccat}})_{\text{对照组}}] dt \\ &= \int_0^t (\Delta R_{10\text{DAB}} - \Delta R_{\text{Baccat}}) dt \\ &\propto \Delta R_{10\text{DAB}} - \Delta R_{\text{Baccat}} \quad (2) \end{aligned}$$

$$\Delta C_{\text{Baccat}} \propto \Delta R_{\text{Baccat}} - \Delta R_{\text{TAXOL}} - \Delta R_{\text{TAXOL}} \quad (3)$$

$$\Delta C_{\text{Ceph}} \propto \Delta R_{\text{Ceph}} - \Delta R_Y \quad (4)$$

$$\Delta C_{\text{TAXOL}} \propto \Delta R_{\text{TAXOL}} - \Delta R_X \quad (5)$$

式(2)~(4)说明了诱导实验与对照组中紫杉醇类物质含量的差异是由于其合成反应与消耗反应的反应速率变化不一致造成的。

如果水杨酸可以诱导 10-DAB 合成酶基因的高水平表达,则 10-DAB 合成酶的活性上升,首先反映为 10-DAB 合成反应的最大比反应速率的提升,进而导致 10-DAB 合成速率 $R_{10\text{DAB}}$ 的提升,即 $\Delta R_{10\text{DAB}} > 0$,同时由于 $\Delta R_{\text{Baccat}} = 0$,所以 $\Delta C_{10\text{DAB}} > 0$ (式 2),即经过一定时间的积累,实验组中的 10-DAB 浓度必然比对照组得以提高。10-DAB 是 Baccatin III 合成的底物,因此当 10-DAB 浓度提高后,必然通过底物效应增加了 Baccatin III 的合成速度 R_{Baccat} ,使得 $\Delta R_{\text{Baccat}} > 0$,所以 $\Delta C_{\text{Baccat}} > 0$ (式 3),即实验组中的 Baccatin III 含量随 10-DAB 的上升而上升;同理,通过底物效应,紫杉醇含量也会随着 Baccatin III 浓度的上升而上升 (式 5)。

因此如果水杨酸的作用部位在 10-DAB 之前,可以诱导 10-DAB 合成酶高效表达,培养体系中的 10-DAB、Baccatin III、和紫杉醇含量都将比对照组出现提高。这种结果恰好与 0.1 mg/L 水杨酸的诱导结果相吻合。

4 诱导子协同配伍方案

诱导子配伍的原则是采用具有不同作用部位的诱导子配伍,从而打破紫杉醇合成的多重限速步骤,全面提高途径中各步的反应速率,进一步提高紫杉醇产量。根据第三部分的动力学分析,诱导子加入后紫杉醇合成途径中代谢通量得到提高的合成步骤与由此导致的紫杉醇谱分布的变化具有某种对应关系,如表 2。

因此选择可以诱导培养体系产生不同紫杉醇谱分布的诱导子来进行配伍,符合以上配伍原则,可能得到比两个诱导子单独诱导时最高紫杉醇含量之和还要高的紫杉醇含量。

在硝酸银诱导下^[9],紫杉醇含量出现上升,而 10-DAB 与 Baccatin III 的含量都比对照组出现下降;而在花生四烯酸^[9]诱导下,实验结果与水杨酸诱导类似,紫杉醇、10-DAB 与 Baccatin III 都比对照组出现上升。对照表 2,水杨酸和花生四烯酸属于第一类诱导子,都是通过诱导 10-DAB 合成速率的提高来提高紫杉醇含量,而硝酸银属于第三类诱导子,是通过诱导 Baccatin III 向紫杉醇转化速率的提高来提高紫杉醇含量。

表 2 诱导子分类表

Table 2 The classification table of elicitors

Category of elicitor	The change of taxoid synthesis rate under elicitation	10-DAB	Baccatin III	Taxol
Class 1	Improve the 10-DAB synthesis rate	increase	increase	increase
Class 2	Improve the reaction rate from 10-DAB to baccatin III	decrease	increase	increase
Class 3	Improve the reaction rate from baccatin III to taxol	decrease	decrease	increase

花生四烯酸和水杨酸、硝酸银和水杨酸配伍实验的实验方法与短期诱导实验相同,不同浓度的配伍方案作用于培养体系后,10 d后的取样中紫杉醇的检测结果显示如下表所示:

表 3 花生四烯酸与水杨酸的协同配伍实验

Table 3 The result of experiments induced by arachidonic acid and salicylic acid

	Arachidonic acid/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)				Salicylic acid/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
	0	0.1	1	10	
	3.1	18	9.8	8.4	0
Taxol ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	13.0	21.5	15.2	8.3	0.1
	4.9	14.1	12.3	5.8	1
	2.2	12.1	9.8	5.2	10

为定量的表征不同诱导子间的协同效应,引入协同作用系数,定义如下:协同作用系数为双诱导子配伍实验中最高紫杉醇产量与两个诱导子单独作用时最高紫杉醇产量之和的比值。按照定义花生四烯酸和水杨酸的协同作用系数为 0.694,硝酸银和水杨酸的协同作用系数为 1.5。

实验结果与预期基本相符,硝酸银和水杨酸配伍具有明显的协同作用,其紫杉醇含量比两个诱导子单独作用时的最高含量之和还高出 50%;而花生四烯酸和水杨酸的配伍紫杉醇含量仅比花生四烯酸单独诱导时略高,远小于两个诱导子单独作用时紫

杉醇的最高含量之和。

表 4 硝酸银与水杨酸的协同配伍实验

Table 4 The result of experiments induced by silver nitrate and salicylic acid

	Silver nitrate/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)				Salicylic acid/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
	0	5	10	100	
	3.2	6	13.2	2.7	0
Taxol ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	13.4	27.4	39.8	22.5	0.1
	4.7	17.8	21.2	11.2	1
	2.2	11.3	13.8	7.8	10

5 结 论

水杨酸的加入可以提高红豆杉培养体系中紫杉醇生物合成途径的代谢通量,0.1 mg/L 的水杨酸诱导 10 d,紫杉醇含量提高到对照组的 4 倍,同时 10-DAB、Baccatin III 都比对照组出现上升。从实验中紫杉醇谱分布的变化初步推断水杨酸的作用部位在 10-DAB 之前,0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水杨酸可以提高 10-DAB 的合成速率。以诱导子的作用部位为基础设计的硝酸银和水杨酸配伍诱导方案,获得了 39 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的紫杉醇含量,比两个诱导子单独作用时的最高含量之和还高出 50%,实现了两个诱导子的协同作用。诱导子协同配伍方案一方面提供了一种提高紫杉醇产量行之有效的方法,同时也为水杨酸的作用部位提供了间接的验证。

参 考 文 献

- [1] 孙大业,郭艳林,马力耕.细胞信号传导(第二版).北京:科学出版社,1998
- [2] CHOI H K, Mannyundong S K, Tom L. WO96/3410
- [3] Ciddi V, Srinivasan V, Shuler M L. *Biotechnology Letters*, 1995, 17(12):1343-1345
- [4] Fett-Neto G, Zhang W Y, Dicosmo F. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 44:205-210
- [5] Hirasuna J, Pestchanker J, Srinivasan V et al. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1996, 44:95-102
- [6] 元英进,胡国武,王传贵等.中国稀土学报,1998,16:56-60
- [7] Moon W J, Yoo B S, Kim D et al. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1996, 44:95-102
- [8] 吴兆亮,元英进,刘家新等.植物学报,1999,41(10):1108-1113

- [9] 苗志奇, 未作君, 元英进. 无锡轻工业大学学报, 1999, **18**(5): 31~34
- [10] Fleming P E, Floss H G, Haertel M *et al.* *Pure and Application Chemistry*, 1994, **66**(10/11): 2045~2048
- [11] Flemin P E, Mocek U, Floss H G. *Journal of American Chemical Society*, 1993, **115**(2): 805~807
- [12] Fleming P E, Knaggs A R, He X G *et al.* *Journal of American Chemical Society*, 1994, **116**(9): 4137~4138

Study on the Effects of Salicylic Acid on Taxol Biosynthesis

MIAO Zhi-Qi WEI Zuo-Jun YUAN Ying-Jin

(*Department of Biochemical Engineering, Tianjin 300072*)

Abstract The influence of salicylic acid on the production of taxanes in plant cell culture was studied. Experimental results showed that addition of salicylic acid at concentration of 0.1 mg/L could enhance the production of taxol to three-fold. The concentration of 10-DAB and baccatin III was also increasing while taxol concentration increases under salicylic acid elicitation. On the basis of the kinetic analysis about the simplified taxol biosynthesis pathway, a probable reason that salicylic acid improves the rate of 10-DAB producing reaction was introduced. The results above can direct its inducing mechanic research and provide the basis of multiple-elicitors synergism. The concentration of taxol arrives at 39 mg·L⁻¹ induced by salicylic acid with silver nitrate, being 150 percent of the sum of taxol obtained under elicitation of salicylic acid and silver nitrate respectively.

Key words Taxol, salicylic acid, acting point of enzyme, plant cell culture