

# 中国红豆杉细胞紫杉醇合成期与非紫杉醇合成期 基因表达差异初步分析

胡国斌<sup>1</sup> 梅兴国<sup>2\*</sup> 龚伟<sup>2</sup> 柯铁<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074 )

<sup>2</sup>( 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850 )

关键词 mRNA 差异显示, 基因表达, 紫杉醇生物合成

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0512-04

紫杉醇(Paclitaxel, 商品名为 Taxol)是存在于红豆杉属(*Taxus* sp.)植物中的一种四环二萜酰胺类化合物,因其具有广谱强效的抗癌活性和独特的抗癌机理而倍受人们关注。然而,紫杉醇天然资源十分有限,自1992年美国食品与药物管理局(FDA)批准紫杉醇用于癌症的临床治疗以来,其供需矛盾日益尖锐<sup>[1]</sup>。目前,普遍认为采用红豆杉细胞悬浮培养生产紫杉醇是解决其药源紧缺问题的最佳途径之一。迄今为止,在红豆杉细胞的代谢规律和培养方面均取得一定成果,但前景仍不容乐观,离工业化大规模生产还有相当大的距离,主要原因在于缺乏紫杉醇生物合成的基础研究<sup>[2]</sup>。因此,详尽了解紫杉醇生物合成的分子基础和遗传调控机制,从而在分子水平实现对紫杉醇合成代谢的人工调控,将是发展先进的生物工艺大量生产紫杉醇的前提。紫杉醇合成动力学研究<sup>[3]</sup>表明,细胞培养法生产紫杉醇可分为两个阶段:非紫杉醇合成期和紫杉醇合成期。前者处于细胞生长周期中的延迟期,后者处于对数期和稳定期,在这一时期可检测出培养物中紫杉醇的产生和积累。作为次生代谢产物,紫杉醇的合成必然涉及到一系列的生化及分子事件,通过系统地比较红豆杉细胞在紫杉醇合成期与非紫杉醇合成期基因表达差异,将有助于阐明紫杉醇合成代谢的分子机理和遗传调控规律。本实验以悬浮培养的中国红豆杉细胞为材料,运用mRNA差异显示技术对红豆杉细胞紫杉醇合成期与非紫杉醇合成期基因的表达差异进行了初步分析。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂

DNasin, M-MuLV 逆转录酶购自 GLBCO-BRL 公司,无 RNase 的 DNase I, Taq 酶购自 Promega 公司。锚定引物为 R<sub>1</sub>: 5'TTTTTTTTTTTC3', R<sub>2</sub>: 5'TTTTTTTTTTTC3', 随机引物为 L<sub>1</sub>: 5'GCTACTAAGG3', L<sub>2</sub>: 5'GGAGCATCGC3', 以上引物由 Sangon

公司合成。

### 1.2 细胞株

实验中所用细胞为中国红豆杉(*Taxus chinensis*)胚性细胞株系 E<sub>2</sub>, 由本实验室提供。

### 1.3 培养基及培养条件

培养基为含蔗糖 20g/L 的改良 B5 培养基,在灭菌前将其 pH 值调整到 5.8。取培养至对数生长期的悬浮细胞,无菌抽滤后以 12%(W/V)的接种密度接种于 250mL 的锥形瓶中,培养基装量为 50mL/瓶,置 24℃、黑暗条件下以 120r/min 转速进行振荡培养,每隔 3d 取样。

### 1.4 紫杉醇含量的测定

参照文献[4]的方法进行。采用 Gilson 全自动高效液相色谱仪进行含量检测,色谱柱为 Kromasil C18 柱(0.46 × 25cm, 5μ),流动相配比为甲醇:乙腈:水 = 25:30:30(V/V/V),流速为 1.0mL/min,检测波长为 227nm,样品中紫杉醇含量以外标法计算。

### 1.5 红豆杉细胞总 RNA 的提取和残存 DNA 的去除

采用改良的异硫氰酸胍一步法<sup>[5]</sup>提取红豆杉细胞总 RNA。取约 50μg 的总 RNA 于 0.5mL 离心管中,加入 10u DNasin, 10u 无 RNase 的 DNase I, 于 70μL 反应体系中 37℃ 温育 30min, 酚、氯仿抽提,无水乙醇沉淀回收 RNA。测定 RNA 260、280、230nm 波长的吸光度(A)值,并经甲醛变性凝胶电泳检测其完整性。

### 1.6 mRNA 差异显示

参照 Bauer 等人<sup>[6]</sup>的方法进行 mRNA 反转录和 PCR 扩增 cDNA。首先以鉴定完好的总 RNA 2μg 为模板,在 M-MuLV 逆转录酶作用下合成 cDNA 第一链。反应体系为 20μL, 42℃ 下反应 1h, 95℃、5min 终止反应。产物经 1:10 稀释后,取 2μL 用于 PCR 反应。在 20μL PCR 反应体系中,加入 1 × PCR 反应缓冲液, 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 锚定引物 2.5μmol/L, 随机引物

0.5 $\mu$ mol/L, 200 $\mu$ mol/LdNTP, 1u Taq 酶, 扩增条件为: Perkin Elmer PCR System 2400 上 94 $^{\circ}$ C 3min, 40 $^{\circ}$ C 2min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 1 个循环, 94 $^{\circ}$ C 55s, 40 $^{\circ}$ C 2min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 38 个循环, 94 $^{\circ}$ C 55s, 40 $^{\circ}$ C 2min, 72 $^{\circ}$ C 5min, 1 个循环。取 10 $\mu$ L PCR 扩增产物, 加 2 $\mu$ L 98% 去离子甲酰胺(含 10mmol/L EDTA pH8.0 0.025% 二甲苯青 FF 0.025% 溴酚蓝), 混匀, 95 $^{\circ}$ C 变性 2min, 于 6% 的尿素变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 以银染法<sup>[7]</sup>显带。

## 2 结果与讨论

### 2.1 中国红豆杉细胞紫杉醇合成期与非紫杉醇合成期的确定

鉴于不同细胞株系在不同的培养条件下进入紫杉醇合成期的时间有所差异, 为了确保后续实验取样的准确性, 我们考察了 E<sub>2</sub> 细胞株合成紫杉醇的动力学特征。如图 1 所示, 在最初的传代培养物中可检测出较低的紫杉醇含量, 在随后的 12d 时间内, 紫杉醇含量呈下降趋势, 导致这一现象产生的原因是在此阶段中细胞尚未合成紫杉醇, 而来自种子细胞的紫杉醇却逐渐降解。培养至第 12 天后, 紫杉醇开始积累, 至第 24 天达到峰值(808 $\mu$ g/L)。由此可见, E<sub>2</sub> 细胞株在摇瓶培养过程中于继代后的第 12 天进入紫杉醇合成期, 这一时间与加拿大红豆杉合成紫杉醇的起始时间一致<sup>[3]</sup>。根据上述结果, 我们分别取第 9 天和第 18 天的细胞作为非紫杉醇合成期和紫杉醇合成期实验材料。

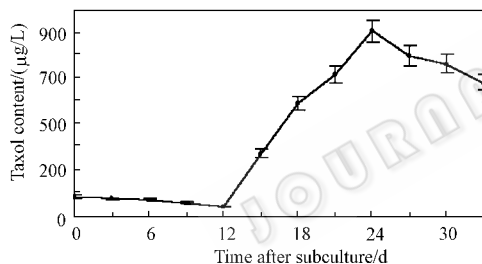


图 1 摇瓶培养过程中中国红豆杉细胞紫杉醇合成动力学曲线  
Fig.1 Kinetics of Taxol production in shake flasks

### 2.2 红豆杉细胞总 RNA 质量分析

使用改良的异硫氰酸胍一步法所提取的红豆杉细胞总 RNA 的  $A_{260}/A_{280}$  值为 1.79,  $A_{260}/A_{230}$  值为 2.02, 这些数据均为典型的 RNA 紫外吸收比值, 表明所获得的 RNA 样品纯度已达到要求。甲醛变性凝胶电泳结果见图 2。从图 2 可以看出, 每一泳道上的 28S rRNA 和 18S rRNA 两条带型均明晰完整。因此, 实验中所获取的 RNA 样品在纯度和完整性方面均符合要求, 用这样的 RNA 样品可以顺利进行后续的 RT-PCR 工作。

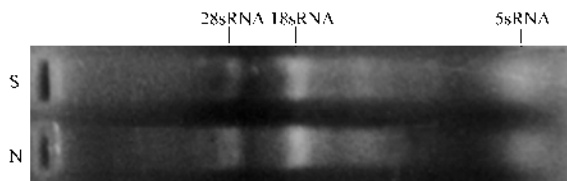


图 2 红豆杉细胞总 RNA 电泳图谱

Fig.2 Electropherogram of total RNA on agarose/formaldehyde gel  
S, N were total RNA from cells during Taxol-synthesis phase and those during non-Taxol-synthesis phase, respectively

### 2.3 红豆杉细胞紫杉醇合成期与非紫杉醇合成期基因表达的差异显示

利用 2 种单碱基锚定引物(T<sub>12</sub>C、T<sub>12</sub>G)与 2 种十聚随机引物组合对两类红豆杉细胞总 mRNA 中的亚群体进行 RT-PCR 扩增, 获得 4 组聚丙烯酰胺凝胶电泳展示的 cDNA 图谱, 共约 300 余个条带(图 3)。由图 3 可见, 引物 L<sub>2</sub> 与 R<sub>1</sub> 组合和 L<sub>1</sub> 与 R<sub>2</sub> 组合扩增的 cDNA 条带相对丰富, 而引物 L<sub>1</sub> 与 R<sub>1</sub> 组合和 L<sub>2</sub> 与 R<sub>2</sub> 组合扩增的 cDNA 条带相对稀少; 并且不同引物组合在两类细胞中, 扩增的 mRNA 亚群的种类及条带数目不同。造成此类现象的原因与引物和模板的碱基组成相关。比较 cDNA 群体的带型, 可以发现红豆杉细胞在紫杉醇合成期与非紫杉醇合成期所表达的 mRNA 大部分相同, 这些相似表达的基因与维持红豆杉细胞的基本生理活动相关, 但约有 20% 左右的 cDNA 带型存在差异, 这些差异主要表现为两类细胞中 mRNA 的质和量发生了变化, 即既有新增的条带, 也有消失的条带, 既有增强的条带, 也有减弱的条带, 表明红豆杉细胞在紫杉醇合成期所表达的基因类型及表达强度均不同于非紫杉醇合成期, 而这些差异表达的基因则可能参与了紫杉醇合成。

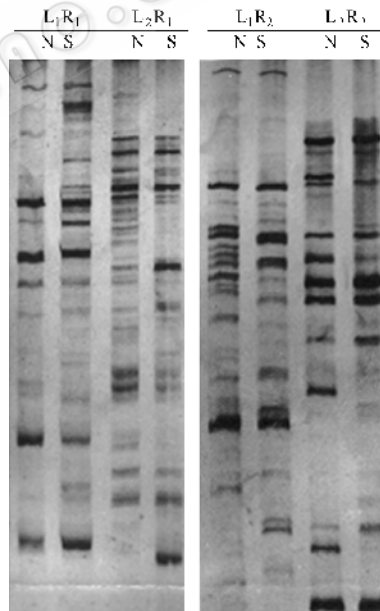


图 3 紫杉醇合成期与非紫杉醇合成期红豆杉细胞基因表达的差异显示图谱

Fig.3 Differential display patterns of mRNA from cells during Taxol-synthesis phase and those during non-Taxol-synthesis phase  
N. Stand for cells in the non-Taxol-synthesis phase; S. Stand for cells in the Taxol-synthesis phase

### 2.4 红豆杉细胞紫杉醇合成期与非紫杉醇合成期基因差异表达的类型

分析 4 组 RT-PCR 扩增引物的扩增结果, 发现红豆杉细胞在紫杉醇合成期与非紫杉醇合成期基因表达差异具有多向性, 表现为以下 4 种类型, 即紫杉醇合成期特异表达(图 4A)、紫杉醇合成期增强表达(图 4B)、紫杉醇合成期减弱表达(图 4C)和紫杉醇合成期不表达(图 4D)。紫杉醇合成期特

异表达的基因极有可能与紫杉醇合成代谢密切相关,紫杉醇合成酶类的编码基因以及相关的调控蛋白的编码基因必定存在于这一基因群中,因此,阐明这类基因结构和功能以及它们的表达调控规律是紫杉醇生物合成分子生物学研究的重要内容。紫杉醇合成期增强表达和减弱表达的基因也是需要予以关注的两类基因群,尽管产生这一现象的原因十分复杂,但是这些基因在紫杉醇合成期的表达发生了改变,提示它们可能涉及紫杉醇合成代谢。最后一种类型的基因是紫杉醇合成期不表达的基因,推测此类基因群与初生代谢关系密切,它们在延迟期后期活跃表达,此时细胞开始大量合成核酸、蛋白质等物质,以满足对数期迅速生长和增殖的需要,导致这类基因不表达的原因可能来自细胞的生长、增殖甚至分化的调控,亦可能来自环境条件的变化,如营养基质的消耗,代谢废物的积累等等。同时,这些因素也深刻影响着前三种类型的基因差异表达。先前的研究<sup>[8]</sup>表明紫杉醇是红豆杉细胞在特定的生长时期所出现的一种具有细胞毒性的次生代谢产物,在正常生理条件下细胞不会大量合成它,只有当环境胁迫因素作用时才会大量合成。我们的研究则从基因表达变化角度揭示紫杉醇合成代谢与细胞的生长和环境因素的相关性,以及代谢规律的复杂性。程宁辉等<sup>[9,10]</sup>曾报道玉米和水稻杂种一代与亲本基因表达差异也具有以上4种类型,指出杂种优势的形成是一个涉及两亲本遗传体系中众多基因相互作用的复杂过程。毫无疑问,红豆杉细胞在紫杉醇合成期与非紫杉醇合成期基因表达差异的多向性表明紫杉醇生物合成的分子基础及调控机制十分复杂,它至少涉及到以下3个方面(1)红豆杉细胞发育过程中基因表达的时序调控(2)环境条件与红豆杉细胞自身遗传体系相互作用,这一作用过程包括紫杉醇合成信号的诱导、传递和效应发挥等(3)初生代谢与次生代谢之间,以及次生代谢内部物质和能量的分配调节。

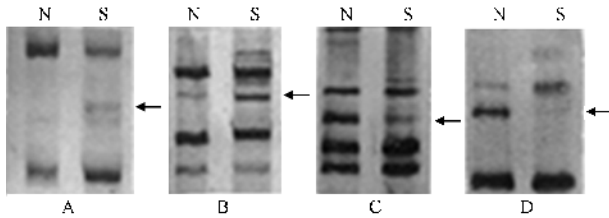


图4 紫杉醇合成期与非紫杉醇合成期红豆杉细胞基因差异表达的类型

Fig.4 Types of difference in gene expression between cells during Taxol-synthesis phase and those during non-Taxol-synthesis phase  
N. Stand for cells in the non-Taxol-synthesis phase; S. Stand for cells in the Taxol-synthesis phase

鉴于红豆杉细胞的生理代谢、生长及增殖调控的复杂性,因此,在紫杉醇合成期所出现的特异表达基因中,除了部分与紫杉醇合成代谢相关外,其他部分可能涉及红豆杉细胞在这一时期的另外一些生命活动过程,如细胞周期的调控、其他代谢产物的合成等。即使如此,此项工作的意义仍然十分重大。因为若回收这些差异条带,并以此制备探针,则有可

能分离出紫杉醇生物合成相关基因,包括关键酶的编码基因。当前已有报道<sup>[11-13]</sup>利用逆向遗传克隆策略和同源PCR克隆策略,分离出数种紫杉醇合成酶类的编码基因,但由于第一种方法不易获得足量的酶蛋白用于氨基酸测序,第二种方法不能分离紫杉醇合成代谢中特有的全新基因,故采用这两种方法分离的基因种类有限,亦未能获得关键酶基因克隆,我们所开展的研究则可在很大的程度上弥补上述不足。在获得酶基因,特别是关键酶基因的基础上,一方面可研究它们的表达调控规律,另一方面可借助重组酶,研究酶自身的活性调节规律,从而可利用这些规律,在分子水平对紫杉醇合成代谢进行有效调控,达到大幅度提高紫杉醇产量的目的。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Gragg G M, Schepartz S A, Suffness M. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *J Nat Prod*, 1995, **56** (10):1657 ~ 1668
- [2] ZHUANG X I(庄晓蕾), ZHANG X Q(张秀清), YU S H(于树宏) *et al.* Advances on the production of taxol in *Taxus* cell culture. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药), 2000, **31**(10): 794 ~ 798
- [3] Hezari M, Ketchum R E B, Gibson D M. Taxol production and taxadiene synthase activity in *Taxus canadensis* cell suspension cultures. *Arch Biochem Biophys*, 1997, **337**(2):185 ~ 190
- [4] YU L J(余龙江), ZHU M(朱敏), ZHOU Y(周莹) *et al.* The induction effect of methyl-jasmonate on Taxol biosynthesis. *Natural Product Research and Development*(天然产物研究与开发), 1999, **11**(5):1 ~ 7
- [5] HU G H(胡国斌), MEI X Q(梅兴国), LIU Y(刘怡). Improved single-step method for extracting total RNA from *Taxus* cells with guanidinium isothiocyanate. *Biotechnology*(生物技术), 2001, **11** (5):31 ~ 33
- [6] Bauer D, Muller H, Reich J. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucl Acids Res*, 1993, **21**(8):4272 ~ 4280
- [7] Doss R P. Differential display without radioactivity-a modified procedure. *Bio Tech*, 1996, **21**:410 ~ 412
- [8] YU L J(余龙江), LI W(李卫), MEI X Q(梅兴国) *et al.* Study on precursors promoting taxol biosynthesis. *Biotechnology*(生物技术), 1999, **9**(1):4 ~ 7
- [9] CHENG N H(程宁辉), YANG J S(杨金水), GAO Y P(高燕萍). Preliminary studies on alteration of gene expression in maize hybrid F1 and its parent. *Chinese Science Bulletin*(科学通报), 1996, **41**(5):451 ~ 454
- [10] CHENG N H(程宁辉), GAO Y P(高燕萍), YANG J S(杨金水) *et al.* Alteration of gene expression in rice hybrid F1 and its parental seedlings. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 1997, **39**(4):379 ~ 382
- [11] Wildung M R, Croteau R. A cDNA clone for taxadiene synthase, the committed step of taxol biosynthe-

sis. *J Biol Chem*, 1996, **271**(16): 9201 ~ 9204

2000, **374**(2): 371 ~ 380

[ 12 ] Walker K, Schoendorf A, Croteau R. Molecular cloning of a Taxa-4 (20)-11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol-O-acetyl transferase cDNA from taxus and functional expression in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys*,

[ 13 ] Walker K, Croteau R. Molecular cloning of a 10-deacetylbaecatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from taxus and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(2): 583 ~ 587

## Differences in Gene Expression Between *Taxus chinensis* Cells During Taxol-synthesis Phase and Those During Non-Taxol-synthesis Phase

HU Guo-Bin<sup>1</sup> MEI Xing-Guo<sup>2\*</sup> GONG Wei<sup>2</sup> KE Tie<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China )

<sup>2</sup>( Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China )

**Abstract** In plant, evocation of secondary metabolism is associated with complex biochemical and molecular events that are regulated by developmental and environmental factors. In order to get more information about Taxol biosynthesis, comparison of mRNA populations from *Taxus chinensis* cells during Taxol-synthesis phase and those during non-Taxol-synthesis phase were performed by mRNA differential display. The results suggested that genes specifically expressed in the Taxol-synthesis phase might be involved in Taxol biosynthesis.

**Key words** gene expression, mRNA differential display, Taxol biosynthesis

Received: 12-21-2001

This work was supported by Grant from the National 9th Five Years Plan Special Research Programs of China (No. 96-C02-03-01).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-66932644; E-mail: hughonline@263.net

### 嗜极生物中的嗜高压生物

在美国有报道说,研究人员选育出了一种既耐高温、耐高压,又能降低原油粘性和净化石油杂质(如硫、氮等)的细菌,将其制成菌剂,为优质石油的开采发挥重要作用。在日本,研究者发现一种熊虫(0.5mm长),生活在石缝中,它在6亿Pa的压力下安然无恙,这一压力是大气压力的6000倍,它能承受如此巨大的压力而不影响其生存,它还具有对温度(-253℃~151℃)高而广的适应范围,实为罕见。目前,美国地球物理研究所一研究小组发现2种耐高压(超过10亿Pa的压力,相当于海平面大气压力的1.6万倍)的微生物,它们是:人们较为熟悉的一种大肠杆菌(*Escherichia coli*)和曾报道具有产强力粘着物质的希瓦氏菌属(*Shewanella*)<sup>\*</sup>的菌*Shewanella oneidensis*;后者能耐受超过10亿Pa的高压,与大肠杆菌一样能在相当于地壳下30km处或海面下100km处的压力下和冰冻态高压下生存,且能进行代谢活动,如能将甲酸盐转化为CO<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>,它们不仅在这种高压下生存和维持代谢功能,而且同时在极端温度环境下生存和繁衍。然而,常规地球生物在这样的高压、高温下是难以适应生存的。因此,人们在思考着,为什么这些嗜极生物能在这种特殊环境中生存,并维持其生命的代谢呢?它们具有什么样的机制以适应生存的本领呢?同时也可以看出,这些发现预示着,向其他星球的表层、里层乃至深处寻找地球外存在生命体的可能性,这些均需要进行深入探究。

\*产粘着物质的考氏希瓦氏菌(*S. colwelliana*)系海洋细菌,产生一种叫多糖粘性外聚物(PAVE),已研制成产品,广泛应用于各个行业。该菌是否耐高压,待究。

(柯为 供稿)