

# $\text{Cu}^{2+}$ 对喜树愈伤细胞中喜树碱合成的影响 Effects of $\text{Cu}^{2+}$ on Biosynthesis of Camptothecin in Cell Cultures of *Camptotheca acuminata*

顾 青<sup>1,2,\*</sup>, 宋达峰<sup>1</sup>, 张 虹<sup>1</sup>, 朱睦元<sup>2</sup>

GU Qing<sup>1,2,\*</sup>, SONG Da-Feng<sup>1</sup>, ZHANG Hong<sup>1</sup> and ZHU Mu-Yuan<sup>2</sup>

1 浙江工商大学生物工程系 杭州 310035

2 浙江大学生命科学院 杭州 310012

1 Department of Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China

2 State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China

**摘 要** 喜树碱是一种从木本植物喜树(*Camptotheca acuminata*)中分离得到的抗癌活性物质,通过细胞培养合成喜树碱是喜树碱生产的一条重要途径。研究  $\text{Cu}^{2+}$  对喜树愈伤细胞培养中喜树碱积累的影响,结果表明,在 B5 培养基中添加 0.008mg/mL  $\text{CuCl}_2$  时,对喜树愈伤细胞的生长没有明显影响,但对喜树愈伤细胞合成喜树碱的促进作用最强,喜树碱含量比未诱导前增加了约 30 倍。 $\text{Cu}^{2+}$  阻止培养细胞后期过氧化物酶活力的下降,并抑制花青素的生成。与黑暗培养相比,光照条件下添加  $\text{Cu}^{2+}$  更利于喜树愈伤细胞诱导合成喜树碱。

**关键词**  $\text{Cu}^{2+}$ , 喜树, 喜树碱, 细胞培养

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)04-0624-05

**Abstract** Camptothecin is a strong anti-tumor compound isolated from *Camptotheca acuminata*. One of the most important way for the production of Camptothecin is by cell cultures of *Camptotheca acuminata*. The effect of  $\text{Cu}^{2+}$  on camptothecin accumulation in *Camptotheca acuminata* cell line was described in this paper. The results showed that the optimum  $\text{CuCl}_2$  concentration in B5 medium was 0.008mg/mL, which increased camptothecin production for 30 times compare to the control while has no inhibitive effects on cell growth, at the same time, the peroxidase activity was increased and the anthocyanidin accumulation was inhibited. The promotive effects of  $\text{Cu}^{2+}$  on camptothecin accumulation in light was higher than that in dark.

**Key words**  $\text{Cu}^{2+}$ , *Camptotheca acuminata*, CPT, cell culture

喜树(*Camptotheca acuminata*)为山茱萸目(Cornales)珙桐科(Nyssaceae)旱莲属植物。分布于我国长江流域及西南各省和印度部分地区,台湾、广西、河南等也有栽培<sup>[1]</sup>。1966年 Wall 等从喜树的皮

中分离出喜树碱(Camptothecin, CPT)<sup>[2]</sup>。1985年 Hisang 等发现 CPT 能阻断拓扑异构酶(topoisomerase I, TopoI)的合成<sup>[3,4]</sup>, CPT 的独特抗癌机理是迄今发现的唯一一种专门通过抑制 TopoI 发挥细胞毒性的

Received: December 29, 2005; Accepted: March 31, 2006.

This work was supported by the grant from the Program for Science and Technology from Zhejiang Province (No. 021101032).

\* Corresponding author. Tel: 86-571-88071024-8599; Fax: 86-571-88053079; E-mail: guqing2002@hotmail.com

浙江省科技计划项目(No. 021101032)

天然植物活性成分。这一发现为喜树碱的进一步临床应用提供了实验基础,掀起了对喜树和喜树碱研究的新高潮<sup>[5]</sup>。目前已经有2种以喜树碱为前体合成的喜树碱衍生物拓扑替康(topotecan)和依诺替康(irinotecan)用于临床,治疗卵巢癌和结肠癌等<sup>[6]</sup>。近年来喜树成为红豆杉之后第二个重要的木本抗癌药用植物,受到国内外研究者的极大关注。

喜树碱及其衍生物在植物体内含量甚微<sup>[7,8]</sup>,且化学合成和半合成也不太理想,喜树碱的天然提取物价格昂贵且供应紧张,特别是喜树的天然资源有限且大量采伐涉及到未来的生态环境问题,所以应用生物技术对喜树进行组织细胞培养被认为是一条很有希望的替代途径而进行研究开发<sup>[9]</sup>。已有报道外源添加铜离子对愈伤细胞中的次生代谢产物有一定的诱导作用<sup>[10,11]</sup>。本实验根据喜树代谢及生理生化特点,通过在B5培养基中添加不同浓度的重金属离子Cu<sup>2+</sup>,研究暗培养和光照条件下喜树碱的生长情况,以及在培养过程中花青素、过氧化物酶代谢情况,并探讨喜树碱代谢及合成积累规律。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

喜树材料取自于浙江大学校园内,编号为6号。由浙江大学生命科学学院徐阿炳教授鉴定。剪取嫩枝条,用自来水冲洗3次,再用双蒸水冲洗3次,滤纸压干。用75%酒精消毒30s,再转移到0.1%的HgCl<sub>2</sub>中消毒5~10min,用无菌水冲洗干净。切取茎段接种于培养基上。愈伤继代培养基为B5+NAA(1.0mg/L)+2A-D(0.5mg/L)+KT(0.5mg/L),pH5.8,培养温度(24±2)℃,每6周继代1次。

### 1.2 Cu<sup>2+</sup>的处理

将愈伤组织接种到含不同浓度Cu<sup>2+</sup>的愈伤组织诱导培养基上,每次接5瓶,每瓶6~8枚。所添加的无水CuCl<sub>2</sub>浓度范围是0.002~0.012mg/mL,接种后的培养瓶于散光光照(24±2)℃条件下或暗培养条件下培养。每隔7天分别测定Cu<sup>2+</sup>培养基中喜树愈伤组织中花青素的含量。每隔3天测定过氧化物酶的活性,并在继代后42d用HPLC测定不同浓度的Cu<sup>2+</sup>培养基中愈伤细胞内喜树碱含量。

### 1.3 喜树碱含量的测定

**1.3.1 仪器与色谱条件:**Waters2996型高效液相色谱仪,C<sub>18</sub>柱,柱型4.6mm×20cm,5μm;流动相为水/甲醇,体积比为60/40,流速为0.8mL/min;二极管阵列(PDA),检测波长为254nm;柱温30℃;进样量

10μL。

**1.3.2 标准曲线的绘制:**喜树碱标准品为Sigma公司产品。精确称量喜树碱标准品8mg于25mL容量瓶,以水/甲醇(体积比为60/40)为溶剂,室温下溶解并定容至刻度,摇匀备用。按照上述色谱条件,分别取稀释后的样品及原标准溶液进样分析,每样重复测定3次,取峰面积的平均值。喜树碱质量浓度Y(mg/L)与峰面积X的线形回归方程为Y=195216X-136619,R<sup>2</sup>=0.9999,线形关系良好。

**1.3.3 喜树碱的提取:**取0.5520g(FW)喜树愈伤组织至1.5mL离心管,加1mL甲醇,超声破碎15s,间隙时间10s,反覆破碎40次。超声破碎后于1550r/min离心8min,倾出上清液,再加入1mL甲醇,超声破碎,合并上清液。

### 1.4 过氧化物酶活性变化的测定

称取喜树愈伤组织1g,置于研钵中,加入20mmol/LKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>5mL,充分研磨成匀浆。在8℃下以4000r/min离心15min,取上清液。残渣加入20mmol/LKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>5mL,在8℃下以4000r/min离心15min,再提取1次。合并两次上清液即为酶的粗提液,低温保存。酶活性检测反应液组成:3mL0.05mol/L磷酸缓冲液,66.7μL30%过氧化氢,1μL愈创木酚和0.1mL酶液。用加热煮沸5min的酶液为对照,当反应体系加入酶液后,迅速置于34℃水浴锅中保温3min,用UV1700在470nm波长下比色。每隔1min记录吸光度,共记录5次。以每分钟内A<sub>470</sub>变化0.01为1个酶活性单位。即以ΔA<sub>470</sub>/(min·g)(FW)表示。

### 1.5 花青素的测定

称取喜树愈伤组织1g,加入0.1mol/LHCl10mL。置于32℃水浴中,浸渍4h。过滤后取滤液用UV1700在波长530nm下测定吸光度,以0.1mol/LHCl为空白对照。以吸光度A<sub>530</sub>为0.01时的花青素浓度为一个单位,比较花青素的相对含量。将测得的吸光度×100,用以代表花青素的相对浓度单位。

## 2 结果

### 2.1 Cu<sup>2+</sup>对喜树愈伤细胞喜树碱合成的影响

愈伤细胞每6周继代1次,并取第6周的细胞为材料测定喜树碱。外源添加不同浓度的铜离子对喜树愈伤细胞中喜树碱含量的影响如图1所示。在B5培养基中分别添加0.002~0.012mg/mL的铜离子诱导愈伤细胞,发现在B5培养基中添加0.002~

0.006mg/mL 的  $\text{CuCl}_2$  时,愈伤细胞内喜树碱的含量基本不变。外源添加铜离子浓度在 0.006 ~ 0.012mg/mL 之间时愈伤细胞中喜树碱的含量有明显的影 响,其中添加 0.008mg/mL  $\text{CuCl}_2$  时细胞中喜树碱含量达到最高。在基本的 B5 培养基上生长的愈伤细胞中喜树碱的含量为 0.04g/kg(鲜重),而在培养基中添加 0.008mg/mL  $\text{CuCl}_2$  时,6 周后愈伤中喜树碱的积累量高达 1.170g/kg(鲜重),喜树碱含量比在基本的 B5 培养基上生长的愈伤增长了 30 倍。但当 B5 培养基添加  $\text{CuCl}_2$  的浓度高于 0.012mg/mL 时,喜树碱生成量反而要低于基本 B5 培养基中积累的喜树碱的含量。

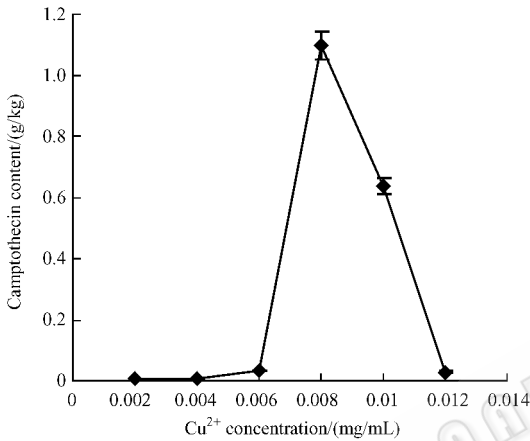


图 1 不同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  对喜树碱合成的影响

Fig.1 The effects of  $\text{Cu}^{2+}$  concentration on Camptothecin biosynthesis

### 2.2 $\text{Cu}^{2+}$ 对喜树愈伤细胞生长的影响

喜树愈伤细胞生长曲线如图 2 所示,由图 2 可知在喜树愈伤细胞 B5 培养基中添加 0.008mg/mL 的  $\text{CuCl}_2$  对喜树细胞的生长影响较小。喜树愈伤细胞在继代初期 0 ~ 12d 时生长极为缓慢为延滞期,继代后近 2 周内细胞观察不到明显增长。从第 12 天到第 36 天为指数生长期,生长代谢趋于旺盛。到第 6 周以后,喜树愈伤细胞进入稳定期。到第 9 周之后喜树细胞就会发生褐变凋亡。

### 2.3 光照影响 $\text{Cu}^{2+}$ 对喜树愈伤细胞喜树碱合成的诱导

不同的培养条件(光照或者暗培养)对喜树愈伤细胞中喜树碱的含量也有一定的影响,取培养 6 周的愈伤细胞为材料测定喜树碱。从图 3 可知,在 16h/d 的光照或者暗培养条件下培养 6 周,基本的 B5 培养基上生长的愈伤中喜树碱含量为 0.04g/kg(鲜重)和 0.03g/kg(鲜重)。而当外源添加 0.008

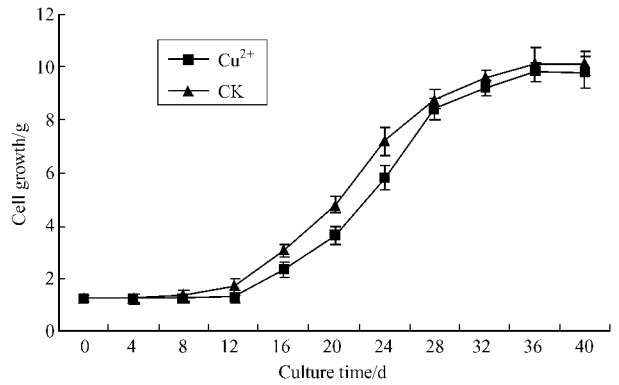


图 2 喜树愈伤细胞生长曲线

Fig.2 Cell growth curve of *Camptotheca acuminata* callus

mg/mL  $\text{CuCl}_2$  时,在光照或者在暗培养条件下愈伤细胞中喜树碱含量分别达到了 1.17g/kg(鲜重)和 0.82g/kg(鲜重)。由以上实验可以得出  $\text{Cu}^{2+}$  的诱导能明显促进喜树细胞内喜树碱的合成,光照培养条件下更有利于喜树愈伤细胞合成喜树碱。

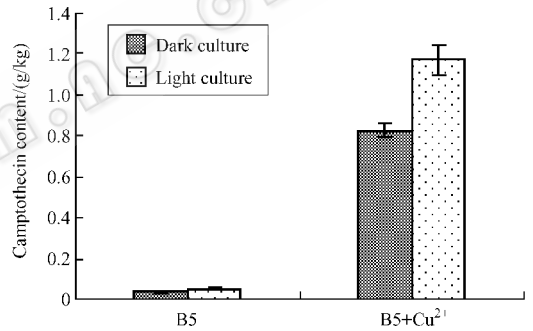


图 3 光照条件及  $\text{Cu}^{2+}$  对喜树碱合成的影响

Fig.3 The effects of  $\text{Cu}^{2+}$  on Camptothecin biosynthesis at illumination condition

### 2.4 $\text{Cu}^{2+}$ 对喜树愈伤细胞内过氧化物酶活性的影响

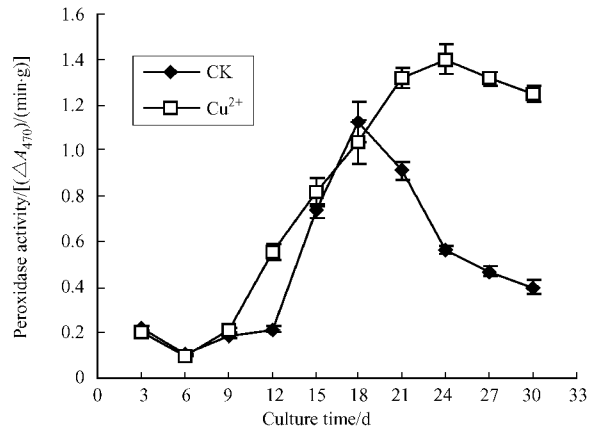


图 4  $\text{Cu}^{2+}$  对喜树愈伤细胞内过氧化物酶活性的影响

Fig.4 The effects of  $\text{Cu}^{2+}$  on the peroxidase activity of *Camptotheca acuminata* callus

谢过程中密切相关的关键性酶<sup>[12]</sup>。随着喜树愈伤细胞的生长、分裂和分化,过氧化物酶活力也有显著的变化。 $\text{Cu}^{2+}$  诱导条件下喜树愈伤细胞内过氧化物酶活性的变化如图 4 所示。在对照的 B5 培养基上喜树细胞的过氧化物酶活性峰值出现在第四周,随后过氧化物酶活性下降,到第 6 周过氧化物酶基本失去活性。而在 B5(附加 0.008mg/mL  $\text{CuCl}_2$  溶液)培养基上喜树细胞内的过氧化物酶活性在前期的短暂生长滞后期以后,活性表现得一直很高,到第 6 周后活性虽略有下降的趋势,但依然保持较高的活性。

## 2.5 $\text{Cu}^{2+}$ 对喜树愈伤细胞内花青素合成的影响

花青素是原花青素在酸性处理下所产生的物质。喜树细胞中花青素通常是以糖苷形式存在,形

成花色苷(anthocyanin),主要是葡萄糖苷。花青素种类甚多,不同花青素具有不同的颜色,而且同一花青素的颜色也会有变化。原花青素属于多酚物质中的类黄酮(flavonoids)物质。在光照条件下喜树愈伤细胞内会产生红色的花青素(如图 5A)。在末添加  $\text{Cu}^{2+}$  离子的 B5 培养基内花青素在培养第四周时出现一个峰值,随后开始下降;而在光照条件下在(B5 +  $\text{CuCl}_2$  溶液)培养基内,花青素含量一直保持着极低的水平(如图 5B 和图 6)。在光照条件下, $\text{Cu}^{2+}$  对喜树愈伤细胞花青素的形成有较强的抑制作用。可能由于  $\text{Cu}^{2+}$  的作用使喜树愈伤细胞内花青素合成代谢途径中的关键酶产生不可逆失活,而阻遏该代谢途径。

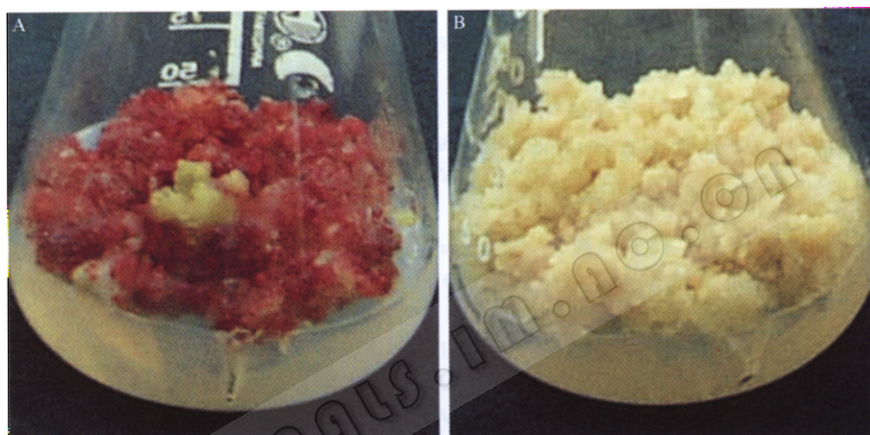


图 5 培养 6 周后喜树愈伤组织

Fig.5 *Camptotheca acuminata* callus after six weeks culture

A: *Camptotheca acuminata* callus culture in B5 medium; B: *Camptotheca acuminata* callus culture in B5 +  $\text{CuCl}_2$  medium.

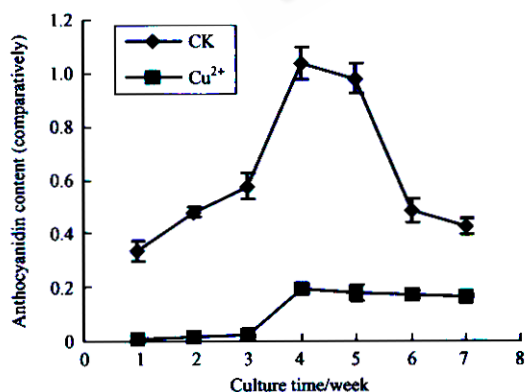


图 6  $\text{Cu}^{2+}$  对喜树愈伤细胞内花青素合成的影响

Fig.6 The effects of  $\text{Cu}^{2+}$  on the anthocyanidin synthesis of *Camptotheca acuminata* callus

## 3 讨论

利用诱导子提高植物培养细胞中目的产物含量的研究,近十几年来一直是国内外研究的热点<sup>[13]</sup>。

目前已有研究发现在红豆杉细胞培养中添加  $\text{Cu}^{2+}$  可以促进紫杉醇的合成<sup>[10]</sup>,并且适量的  $\text{Cu}^{2+}$  不会影响植物细胞的生长。在银杏的组织培养中也发现外源添  $\text{Cu}^{2+}$  加对银杏细胞产生黄酮有一定的促进作用。因此  $\text{Cu}^{2+}$  被认为是一种良好的非生物诱导子<sup>[14]</sup>。

喜树植物中喜树碱的次生代谢途径目前还不很明确。用诱导子处理可能增加原代谢途径中关键酶的活性,或活化次生代谢途径中特定酶基因,从而诱导新酶的形成。由酶活性提高或新酶产生,进一步提高植物细胞中原来次生代谢物的含量,或合成新的次生产物,最终促进目的产物的合成。本研究通过在培养基中添加不同浓度的铜离子来考察喜树愈伤组织细胞内喜树碱的含量的变化。研究表明:(1)在适量添加  $\text{Cu}^{2+}$  离子时,愈伤细胞中喜树碱含量有显著提高。(2)不同的光照条件对喜树碱的合成也有一定的影响,与暗培养相比,光照条件下  $\text{Cu}^{2+}$  对

愈伤细胞中喜树碱合成积累影响更加明显。(3)外源铜离子的添加,阻止了培养细胞后期过氧化物酶活力的下降,说明铜离子可能通过抑制过氧化物酶的活力衰退或类似原代谢途径中关键酶的活性,从而提高植物细胞中次生代谢物的产量。(4)光照条件下喜树愈伤细胞内会产生红色的花青素,而  $\text{Cu}^{2+}$  对喜树愈伤细胞花青素的形成有较强的抑制作用。这可能由于  $\text{Cu}^{2+}$  使喜树愈伤细胞内花青素合成代谢途径中的关键酶产生不可逆失活,从而阻遏该代谢途径,但同时  $\text{Cu}^{2+}$  能较强地激活喜树碱合成代谢途径中的关键酶,从而显著地增加愈伤细胞中喜树碱的含量。这2个途径对喜树细胞生理及代谢的作用以及它们之间的关系尚待深入研究。

在植物次生代谢产物合成过程中,非生物诱导子添加的浓度与次生代谢合成关键酶的活性有极其重要的关系。本研究用非生物诱导子  $\text{Cu}^{2+}$  作为外源诱导剂,较高效率地增加了细胞中喜树碱的含量,为用植物生物反应器生产喜树碱提供了较好的理论基础和规模化生产的可能性。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] China Academy of Sciences Flora Reipublicae Popularis Sinica(中国科学院中国植物志编辑委员会). Beijing: Science Press. *Flora Reipublicae Popularis Sinica*(中国植物志), 1982, **5X**(2): 144 - 145
- [ 2 ] Wall ME, Wani MC, Cooke EC *et al.* Plant antitumor agents I. the isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukaemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *Journal of American Chemical Soc*, 1966, **88**: 3888 - 3890
- [ 3 ] Hsiang YH, Herizberg R, Hecht S *et al.* Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, **260**(27): 14873 - 14878
- [ 4 ] Lopez-Meyer M, Nessler CL, McKnight TD. Sites of accumulation of

antitumor alkaloid camptothecin in *Camptotheca acuminata*. *Planta Medica*, 1994, **60**: 558 - 560

- [ 5 ] Rocio GC, Jeffrey GS. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. *Clinical Cancer Research*, 2002, **8**: 641 - 661
- [ 6 ] Creemers JP, Despas R, Favalli G *et al.* Topotecan, an active drug in the second-line treatment of epithelial ovarian cancer: results of a large European phase II study. *Journal of Clinical Oncology*, 1996, **14**: 3056 - 3061
- [ 7 ] Helmut W, Miroslawa F, Erhard R *et al.* Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, **49**: 213 - 218
- [ 8 ] Liu WX(刘文哲). Improved camptothecin production by cell lines of *Camptotheca Acuminata*. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica* (实验生物学报), 2003, **36**(4): 275 - 278
- [ 9 ] Guan S(关水), An LJ(安利佳). Advances of researches on regulation of metabolism involved in biosynthetic pathway and production of camptothecin in *Camptotheca acuminata*. *High Technology Letters*(高技术通讯) 2005, **4**: 106 - 110
- [ 10 ] Li JH(李家儒), Guan ZY(管志勇), Liu MX(刘曼西) *et al.* Effects of  $\text{Cu}^{2+}$  on taxol formation in cell cultures of *Taxus chinensis*. *Journal of Huazhong Agricultural University*(华中农业大学学报), 1999, **18**(2): 117 - 120
- [ 11 ] Morin I, Guillel M, Lowe J *et al.*  $\text{Cd}^{2+}$ - or  $\text{Hg}^{2+}$ -binding proteins can replace the  $\text{Cu}^{2+}$ -chaperone Atx1 in delivering  $\text{Cu}^{2+}$  to the secretory pathway in yeast. *FEBS Letters*, 2005, **579**: 1117 - 1123
- [ 12 ] Gu W, Shi GX, Zhang CY *et al.* Toxic effects of  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  on photosynthetic systems and protective enzyme systems of *Potamogeton crispus*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2002, **28**(1): 69 - 74
- [ 13 ] Christen AA, Gibson DM, Bland J. Production of taxol or taxol like compounds in cell culture. US Patent, 5 019 504, 1991
- [ 14 ] Shang FD(尚福德), Ma YF(马云峰). The effect of different concentrations of  $\text{La}^{3+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  on flavonoid production in solid and liquid culture of *Ginkgo biloba L.* *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2003, **23**(9): 1577-1580