

文章编号: 1000-5692(2006)03-0280-05

光照对喜树愈合组织生理及喜树碱合成的影响

顾青^{1,2}, 朱睦元²

(1. 浙江工商大学 生物工程系, 浙江 杭州 310035; 2. 浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310012)

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研究是喜树碱生产的一条重要途径。光照对喜树愈合组织生理生化特性、花色苷形成及喜树碱合成影响的研究结果显示, 在光照和暗培养条件下, 喜树愈合组织可溶性蛋白质质量分数、可溶性糖质量分数和过氧化物酶(POD)活力均呈逐渐上升趋势, 培养第3周达到峰值; 光照对喜树愈合组织中花色苷的形成具有极重要的影响。与暗培养相比, 光照培养可以促进喜树愈合组织的生理代谢, 且对喜树碱的合成和积累有一定的促进作用。图5表1参14

关键词: 植物学; 喜树; 喜树碱; 愈合组织; 光照

中图分类号: S718.43 **文献标识码:** A

喜树碱(camptothecin, 简称CPT)为一种生物碱, 1966年美国的Wall等^[1]首先从喜树 *Camptotheca acuminata* 中分离提取喜树碱并进行了结构鉴定, 证明它对多种动物肿瘤有显著疗效, 临床上治疗胃癌、肝癌、结肠癌及白血病等有较好的效果^[2]。喜树碱类药物为细胞周期特异性抗肿瘤药物^[3], 主要作用于S期细胞, DNA拓扑异构酶I(Topto I)是其作用靶点, 由于喜树碱稳定了Topto I-DNA断裂复合物, 抑制了复制的进行, 从而遏制了复制叉的移动; 同时喜树碱使Topto I-DNA断裂复合物的物理特性发生改变, 当停用药物后, 也不能使断裂复合物还原, 形成了喜树碱S期特异性细胞杀伤作用的机制^[4]。自20世纪90年代来, 美国、日本、加拿大和英国等国家积极投入大量人力物力进行喜树引种和栽培等的研究和喜树碱开发, 喜树成为红豆杉 *Taxus chinensis* 之后第2个重要的木本抗癌药用植物。喜树碱是喜树的次生代谢产物, 含量很少, 分离提取纯单体的成本很大, 并受到天然资源、病虫害、气候和环境等因素的制约。通过植物细胞培养生产喜树碱已受到国内外研究者的广泛关注^[5-8]。喜树细胞中喜树碱合成受到温度、光照等环境因素的影响。光质作为一种物理因子, 广泛用于植物次生代谢产物合成及其各种反应机理的研究。何梦玲等^[9]研究了不同光质对喜树细胞培养生长和生理生化特性的影响。但目前尚无有关光质对喜树细胞中喜树碱合成和积累影响的研究报告。实验对光照处理对喜树细胞中可溶性糖类、可溶性蛋白质和过氧化物酶活性、花色苷的产生等生理指标的影响进行了研究, 并考察了不同光照条件对喜树合成喜树碱的影响, 为药用植物喜树的开发利用提供更多的理论基础和科学依据。

收稿日期: 2005-11-18; 修回日期: 2006-03-10

基金项目: 浙江省科学技术攻关项目(021101032)

作者简介: 顾青, 副教授, 博士, 从事遗传学与基因工程研究。E-mail: guqing2002@hotmail.com

1 材料与方 法

1.1 材料培养

实验材料为实验室诱导的喜树愈合组织。用 B5+NAA (1.0 mg \cdot L $^{-1}$)+2, 4-D (0.5 mg \cdot L $^{-1}$)+KT (0.5 mg \cdot L $^{-1}$)为继代培养基, 培养基 pH5.8, 培养温度(24 \pm 2) $^{\circ}$ C。将诱导出的愈合组织接种于含 50 mL 固体培养基容量为 100 mL 的三角瓶或含 20 mL 固体培养基直径为 10 cm 的平板中。培养条件为: ① (24 \pm 2) $^{\circ}$ C, 黑暗; ② (24 \pm 2) $^{\circ}$ C, 16 h 光照(300 μ mol \cdot m $^{-2}$ \cdot s $^{-1}$), 8 h 黑暗。每隔 7 d 测 1 次喜树愈合组织中花色苷的相对浓度、可溶性蛋白质、可溶性糖类及喜树碱的质量分数。每隔 3 d 测 1 次过氧化物酶的活力。

1.2 花色苷相对浓度的测定

取喜树愈合组织 1 g 于烧杯中, 加入 0.1 mol \cdot L $^{-1}$ HCl 10 mL, 于 32 $^{\circ}$ C 水浴 4 h。随后过滤, 取滤液用分光光度计测吸光度。以鲜质量材料的光密度值 ΔD (D_{530nm}) \cdot g $^{-1}$ 表示喜树愈合组织中花色素苷的相对浓度。

1.3 可溶性蛋白质质量分数的测定

可溶性蛋白质质量分数的测定按考马斯亮蓝法^[10], 以牛血清蛋白为标准。

1.4 可溶性糖质量分数的测定

蒽酮比色法测定试样可溶性糖质量分数^[11]。

1.5 过氧化物酶活力的测定

过氧化物酶活性的测定采用愈创木酚法^[12], 取喜树愈合组织 1 g 于 pH 6.5, 20 mmol \cdot L $^{-1}$ 的磷酸缓冲液(含 0.1 mmol \cdot L $^{-1}$ EDTA, 3 g \cdot kg $^{-1}$ Triton X-100, 40 g \cdot kg $^{-1}$ PVP)中研磨, 于 4 $^{\circ}$ C, 1.3 万 r \cdot min $^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液 4 $^{\circ}$ C 保存。残渣加入 20 mmol \cdot L $^{-1}$ 磷酸缓冲液 5 mL 再提取 1 次, 4 $^{\circ}$ C, 1.3 万 r \cdot min $^{-1}$ 离心 15 min, 合并两次上清液用于酶活性分析。

配制酶的反应体系包括: 3 mL 0.05 mol \cdot L $^{-1}$ 磷酸缓冲液, 66.7 μ L 300 mL \cdot L $^{-1}$ 过氧化氢, 1 μ L 愈创木酚和 0.1 mL 酶液。以加热煮沸 5 min 的酶液为对照, 当反应体系加入酶液后, 立即于 34 $^{\circ}$ C 水浴锅中保温 3 min, 然后迅速在 470 nm 下比色。隔 1 min 记录 1 次吸光度, 共记录 5 次。以鲜质量计, 1 g 愈合组织 1 min 内 A_{470} 变化为一个酶活力单位。

1.6 喜树碱质量分数的测定

用高效液相色谱法(HPLC)测定喜树愈合组织中喜树碱的质量分数。样品处理: 取 0.552 0 g (鲜质量)喜树愈合组织至 1.5 mL 离心管, 加 1 mL 甲醇, 在功率为 7 200 下超声破碎 15 s, 间隙时间 10 s, 工作次数 40 次。超声破碎后在 1 550 r \cdot min $^{-1}$ 条件下离心 8 min, 倾出上清液, 再往离心管中加入 1 mL 甲醇, 超声破碎, 合并上清液, 4 $^{\circ}$ C 下保存待测。分析条件: Waters 2695 型高效液相色谱仪, C18 柱, 柱型 4.6 mm \times 20 cm, 5 μ m; 流动相为水:甲醇, 体积比为 60:40, 流速为 0.8; 检测波长为 254 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。喜树碱标准品由实验室自制, 纯度 99.82%。

1.7 数据分析

实验至少重复 3 次, 根据实验重复次数计算平均值和标准误。

2 结果与分析

2.1 光照对喜树愈合组织生长的影响

喜树愈合组织生长曲线如图 1 所示。喜树愈合组织在继代初期第 0~12 天时生长极为缓慢, 为延滞期, 继代后近 2 周内愈合组织观察不到明显增长。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, 喜树愈合组织进入稳定期。到第 9 周之后喜树细胞就会发生褐变凋亡。

2.2 光照对喜树愈合组织花色苷合成的影响

在光照条件下, 随着培养时间的增长, 喜树愈合组织表面会出现红色的花色苷类物质, 并且随着培养时间延长颜色逐渐变深。喜树愈合组织在光诱导下产生了花色苷。培养 4 周, 花色苷的相对浓度

达到最大, 随后逐渐平缓下降(图2)。在暗培养下测得的花色苷相对浓度趋近于0, 说明暗培养下无花色苷产生。

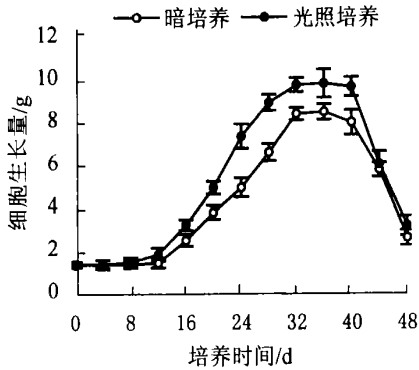


图1 光照和暗培养条件下喜树愈合组织生长曲线

Figure 1 Cell growth curve of *Camptotheca acuminata* callus at different illumination conditions

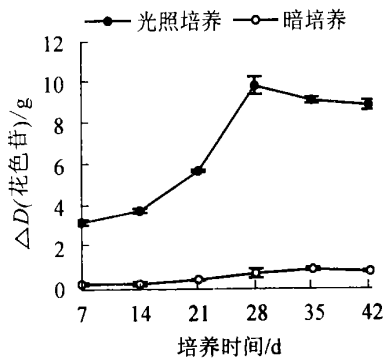


图2 光照培养和暗培养条件下喜树愈合组织花色苷相对浓度的变化

Figure 2 The anthocyanidin synthesis of *Camptotheca acuminata* callus at different illumination conditions

2.3 光照对喜树愈合组织可溶性蛋白质质量分数变化的影响

在光照条件下, 喜树愈合组织可溶性蛋白质质量分数的变化见图3。喜树愈合组织在前3周的蛋白质质量分数不断增加, 在第3周时达到峰值。3周后, 愈合组织中蛋白质质量分数不断下降。在前期培养中, 愈合组织生长状态良好, 喜树细胞的生长活力较好, 蛋白质合成代谢旺盛。培养后期, 随着愈合组织的褐变和逐渐凋亡, 喜树细胞生长活力下降, 蛋白质合成代谢缓慢, 并有部分蛋白降解, 可溶性蛋白质质量分数下降。相对于暗培养, 光照条件下愈合组织蛋白质合成速度较快, 第4周以后不同培养条件下的喜树愈合组织中的蛋白质质量分数接近。

2.4 光照对喜树愈合组织可溶性糖质量分数的影响

喜树愈合组织可溶性糖的质量分数在前3周呈平缓上升, 第3周达峰值, 并在随后的培养中质量分数逐渐下降。在培养后期, 愈合组织生长活力降低, 细胞老化, 细胞内的分解代谢比合成代谢活跃, 糖类物质分解。光照培养比暗培养的糖代谢相对活跃(图4)。

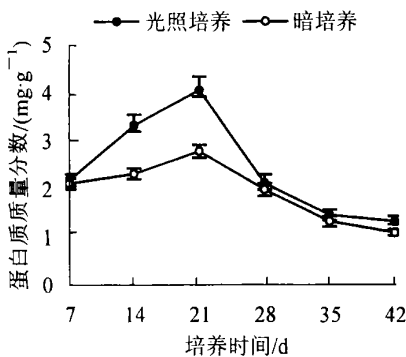


图3 光照培养与暗培养条件下喜树愈合组织可溶性蛋白质质量分数的变化

Figure 3 The contents of soluble protein of *Camptotheca acuminata* callus at different illumination conditions

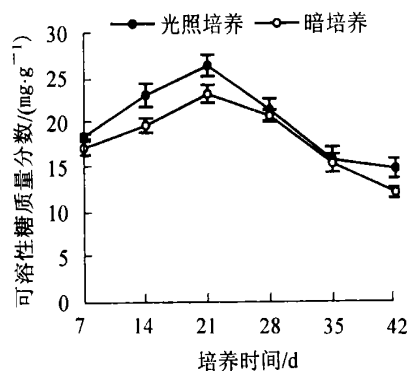


图4 光照培养和暗培养条件下喜树愈合组织可溶性糖质量分数的变化

Figure 4 The contents of soluble carbohydrate of *Camptotheca acuminata* callus at different illumination conditions

2.5 光照对喜树愈合组织过氧化物酶活力的影响

培养细胞中过氧化物酶活力变化如图5所示。在愈合组织培养前期, 过氧化物酶活力逐渐上升, 到第3周达到峰值, 之后逐渐平稳下降。光照条件下, 在第3周时愈合组织酶活力有明显的上升。因

此, 光照可以提高愈合组织中过氧化物酶的活性, 从而影响喜树愈合组织生理活性。

2.6 光照对喜树愈合组织中喜树碱合成的影响

在光强为 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 下进行 $16 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 光照培养及暗培养, 测定了不同培养条件下愈合组织中喜树碱的质量分数(表 1)。试验结果表明, 随着光照时间的延长, 喜树碱质量分数在第 3 周时达到峰值, 以后其质量分数平缓下降, 但在整个培养过程中喜树碱质量分数变化不明显; 与暗培养相比, 在光照培养条件下, 喜树碱质量分数虽有略微的上升, 但经显著性分析, 并无显著性影响。

3 讨论

该项研究以喜树幼嫩叶片为外植体进行离体培养, 将经继代稳定后生长良好的愈合组织在光照条件下培养, 一段时间后, 发现愈合组织的表面出现了红色物质。大量的文献表明此种红色物质为花色苷。随着培养时间的延长, 喜树愈合组织表面出现的红色逐渐变深。花色苷主要是由花色素与植物细胞内的糖结合而成, 主要是葡萄糖苷。花色苷属类黄酮物质, 广泛存在于植物体内, 具有多种重要的生理作用。该项研究结果表明, 光照对花色苷的产生具有明显的作用。但经相关性分析, 花色苷的产生和喜树碱的合成没有显著的关联。

在光照条件下, 喜树愈合组织可溶性蛋白质质量分数在前 3 周呈上升趋势, 并在第 3 周达到最大值, 而在后 3 周的培养中蛋白质质量分数下降较快。在前期培养中, 愈合组织生长状态良好, 蛋白质合成代谢旺盛。培养后期, 随着愈合组织的褐变和细胞凋亡, 喜树的生长活力下降, 可溶性蛋白质质量分数下降。一般认为, 一些调节酶类是细胞内的可溶性蛋白质, 喜树愈合组织内喜树碱的合成和积累受这些蛋白的影响。有关细胞内与喜树碱合成相关的酶目前还不清楚, 尤其是关键酶等主要的喜树碱的合成代谢的酶系有待于进一步的深入探讨。

可溶性糖质量分数在前 3 周平缓上升, 第 3 周达峰值, 随后其质量分数逐渐下降。在培养后期, 愈合组织生长活力降低, 细胞老化, 细胞内的分解代谢比合成代谢活跃, 导致糖类的分解。光照培养比暗培养的糖代谢相对活跃, 说明光照条件下细胞中代谢活动旺盛。有研究表明, 喜树愈合组织中过氧化物酶活力的逐渐上升可能是接种时的细胞损伤反应所引起^[9]。Galston 等^[13]认为损伤能使合成该酶的基因去抑制, Ridge 等^[14]则认为是损伤使过氧化物酶合成抑制物渗漏, 导致酶活性增强。试验表明, 光诱导可以明显提高愈合组织中过氧化物酶的活性。在光照条件下, 喜树愈合组织中的可溶性蛋白质、可溶性糖和过氧化物酶的水平都比暗培养下略高, 同时光照能一定程度地促进喜树愈合组织中喜树碱的合成和积累。喜树愈合组织中生物大分子和喜树碱生物合成的关系以及环境因素对喜树碱的诱导等机理尚待深入的研究。

参考文献:

- [1] WALL M E, WANIM C, COOK C E, *et al.* Plant antitumor agents (I) The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. *J Am Chem Soc*, 1966, **88**: 3 888-3 890.
- [2] TAKIMOTO C H, WRIGHT J, ARBUCK S G. Clinical applications of the camptothecins [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1998,

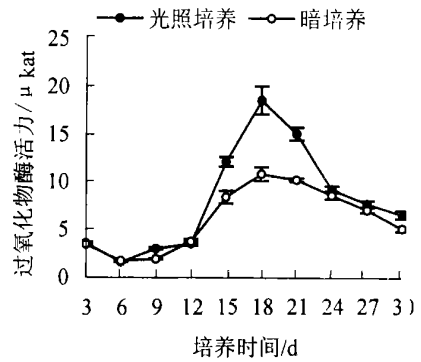


图 5 光照培养和暗培养条件下喜树愈合组织过氧化物酶活力的变化

Figure 5 The peroxidase activity of *Camptotheca acuminata* callus at different illumination conditions

表 1 光照培养与暗培养对喜树碱合成的影响

Table 1 The effect of camptothecin biosynthesis at different illumination conditions

| 培养时间/周 | 喜树碱质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) | |
|--------|---|-------------|
| | 暗培养 | 光照培养 |
| 1 | 0.027±0.006 | 0.029±0.007 |
| 2 | 0.035±0.009 | 0.041±0.015 |
| 3 | 0.038±0.012 | 0.045±0.016 |
| 4 | 0.030±0.007 | 0.038±0.011 |
| 5 | 0.032±0.007 | 0.040±0.009 |
| 6 | 0.032±0.013 | 0.036±0.010 |

- [3] 周国模, 李孝青, 储家森, 等. 喜树幼树和萌芽条生长规律及性状相关[J]. 浙江林学院学报, 2000, 17 (4): 355—359.
- [4] KJELDSEN E, SVEJSTRUP J Q, GROMOVA I L, *et al.* Camptothecin inhibits both the cleavage and relegation reactions of eukaryotic DNA topoisomerase I [J]. *J Mol Biol*, 1992, 28: 1 025—1 030.
- [5] ROJA G, HEBLE M R. The quinoline alkaloids camptothecin and 9-methoxy camptothecin from tissue cultures and mature trees of *Nothapodytes foetida* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36: 65—66.
- [6] WIEDENFELD H, FURMANOWA M, ROEDER E, *et al.* Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca acuminata* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1997, 49: 213—218.
- [7] CIDDIV, SHULER M L. Camptothecine from callus cultures of *Nothapodytes foetida* [J]. *Biotechnol Lett*, 2000, 22: 129—132.
- [8] SAITO K, SUDO H, YAMAZAKIM, *et al.* Feasible production of camptothecin by hairy root culture of *Ophiohiza pumila* [J]. *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 267—271.
- [9] 何梦玲, 周吉源. 不同光照对喜树细胞培养生长和生理生化特性的影响[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2002, 36 (4): 489—493.
- [10] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248—254.
- [11] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1989.
- [12] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海植物生理学会. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [13] GALSTON A W, DAVIS J P. Homonal regulation in higher plants [J]. *Science*, 1969, 163: 1 288—1 297.
- [14] RIDGE I, OSBORNE D I. Regulation of peroxidase activity by ethylene in *Pisum-sativum*; regiments for protein and RNA synthesis [J]. *J Exp Bot*, 1970, 21: 720—734.

Effects of light on physiology and camptothecin accumulation in *Camptotheca acuminata* callus

GU Qing^{1,2}, ZHU Mu-yuan²

(1. Department of Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, Zhejiang, China; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, Zhejiang, China)

Abstract: Camptothecin is produced by *Camptotheca acuminata*, which is a secondary metabolite with strong anti-tumor activity. To sustain a stable production of camptothecin, a number of attempts have been made for production of camptothecin by cell culture with *Camptotheca acuminata*. Effects of light on the contents of soluble protein, soluble carbohydrate, anthocyanins, activities of peroxidase (POD) and camptothecin accumulation in *Camptotheca acuminata* tissue callus were examined. The results showed that the contents of soluble protein, soluble carbohydrate were changed almost identical, and up to the peak after three weeks, and the contents of anthocyanins was increased remarkably in light ($300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) condition. The results also showed that the light had effects on physiology in *Camptotheca acuminata* cell line, and a little promotion on camptothecin accumulation with those in darkness. [Ch. 5 fig. 1 tab. 14 ref.]

Key words: botany; *Camptotheca acuminata*; camptothecin; callus; light