

胡桐悬浮培养细胞中苯丙氨酸解氨酶活性与红厚壳素产量的关系

崔堂兵^{1,*} 罗焕亮¹ 郭勇¹ 王菊芳¹ 代建国²

¹华南理工大学食品与生物工程学院, 广州 510641; ²深圳职业技术学院生物应用工程系, 深圳 518055

摘要 胡桐CR2细胞悬浮培养过程中, 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性上升后红厚壳素产量即增加。加入真菌诱导子后, PAL活性与红厚壳素产量呈一定的正相关。以PAL抑制物降低PAL活性后, 红厚壳素产量也降低; 诱导物与抑制物同时加入, PAL活性与红厚壳素产量均介于诱导物处理与未处理之间。

关键词 苯丙氨酸解氨酶; 细胞悬浮培养; 红厚壳素; 胡桐

Relationship Between Phenylalanine Ammonia-lyase Activity and Inophyllums Production in Suspension Cultured Cells of *Calophyllum inophyllum*

CUI Tang-Bing^{1,*}, LUO Huan-Liang¹, GUO Yong¹, WANG Ju-Fang¹, DAI Jian-Guo²

¹College of Food & Bioengineer, South China University of Technology, Guangzhou 510641; ²Department of Applied Biological Engineering, Shenzhen Polytechnic College, Shenzhen 518055

Abstract Changes in phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity and inophyllums production were analysed, showing that PAL activity increased preceding the inophyllums production during the process of suspension culture. PAL activity changed after adding fungal elicitor, followed by changes of inophyllums production. Addition of the PAL inhibitor *L*-2-amono-3-phenylpropionic acid at 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ suppressed the induction of PLA activity and the corresponding inophyllums production. When the fungal elicitor was added with the inhibitor, the both PAL activity and inophyllums production were between those induced by fungal elicitor and control. There existed a significantly correlation between PAL activity and inophyllums yield in CR2 suspension cultured cell of *Calophyllum inophyllum*.

Key words phenylalanine ammonia-lyase; cell suspension culture; inophyllums; *Calophyllum inophyllum*

红厚壳素被认为是很有开发潜力的抗艾滋病的免疫缺陷病毒(HIV)天然药物^[1]。热带雨林树种胡桐(*Calophyllum inophyllum*)即含有这类物质^[2]。我国仅在海南岛有胡桐植物分布, 储量并不丰富。为了不破坏胡桐植物资源而又能获得红厚壳素, 我们从2000年起着手通过胡桐细胞培养生产红厚壳素的研究, 并建立了胡桐细胞悬浮培养体系, 选育出相对高产的胡桐CR2细胞株。为进一步提高胡桐悬浮培养细胞中红厚壳素的产量, 本文探讨胡桐细胞中与产生红厚壳素有关的苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)活性变化, 及其与红厚壳素产量的关系, 以期提高红厚壳素的产量。

材料与方法

取经选育、生长稳定的胡桐(*Calophyllum*

inophyllum)CR2愈伤组织, 按5 g(DW)·L⁻¹的接种量, 接种于添加2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D、0.32 mg·L⁻¹ 6-BA、35 mg·L⁻¹蔗糖的B₅新鲜液体培养基中, 悬浮培养的温度为25℃, 全天光照, 光照度1200 lx, 摇床转速为110 r·min⁻¹。

从感病的胡桐叶中分离的病原菌——壳多孢菌(*Stagonospora curtisii*), 诱导胡桐悬浮培养细胞产生红厚壳素。用改良的PDA^[3]培养基震荡, 于25℃下暗培养3 d后挑取菌丝接种在上述去掉琼脂的液体培养基中, 暗培养6 d (120 r·min⁻¹)后抽滤收集菌丝, 用蒸馏水清洗3次, 清洗后的菌丝加等体积蒸馏水匀浆, 抽滤得菌丝提取液, 分别制成真

收稿 2004-10-13

资助 广州市科技新星计划项目(2000-K-003-01)。

* E-mail: fetbcui@scutedu.cn, Tel: 020-87113847

菌诱导子, 于121℃下消毒25 min备用。诱导子加入量按菌液中的含糖量计算, 单位为 $\text{mg}(\text{GE}) \cdot \text{L}^{-1}$ (GE: glucose equivalent, 葡萄糖当量), 糖含量测定用蒽酮法^[4]。

经布氏漏斗真空抽滤后, 收集培养液, 测定红厚壳素含量。细胞用5倍体积的蒸馏水充分洗涤, 抽干后称细胞湿重, 于60℃烘箱中烘干至恒重, 放在干燥器中冷却后称细胞干重, 计算细胞含水率。生物量以每升培养基中细胞干重表示 $[\text{g}(\text{DW}) \cdot \text{L}^{-1}(\text{培养液})]$ 。同时, 测定细胞中红厚壳素含量。以红厚壳素P(inophyllum P)为标准品, 按略加修改的文献5的方法, 以HPLC检测红厚壳素含量 $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ 。

苯丙氨酸解氨酶活性按文献6的方法测定。取5 g过滤收集的培养细胞, 加10 mL含5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 巯基乙醇的硼酸缓冲液、0.5 g聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、少量石英砂在研钵中研磨, 用23 kHz超声波破碎。匀浆后抽气过滤, 滤液以11 180 g离心15 min, 上清液为酶粗提液。上述操作均在0~4℃下进行。测定酶活性: 取1 mL酶液, 加1 mL 0.02 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-苯丙氨酸、2 mL蒸馏水, 总体积为4 mL; 对照不加底物, 加1 mL蒸馏水。反应液置30℃恒温水浴中保温。0.5 h后用紫外分光光度计测定290 nm处光密度值。以每小时在290 nm处光密度值变化0.01所需酶量为1单位(相当每毫升反应物形成肉桂酸)。

实验结果

1 胡桐CR2细胞悬浮培养过程中的PAL活性和红厚壳素产量变化

图1显示, PAL活性在接种后6 d开始快速

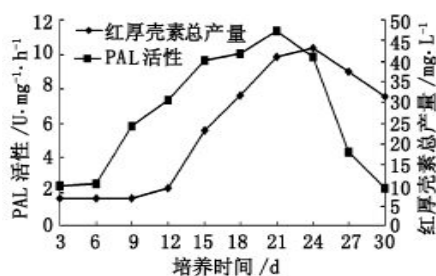


图1 CR2细胞悬浮培养过程中PAL活性与红厚壳素产量的变化

Fig. 1 Changes in PAL activity and yield of inophyllums in cell suspension culture of *C. inophyllum*

上升, 21 d达最大值, 之后急速下降, 30 d又回落到初培养时的水平。而红厚壳素积累比PAL活性上升速度明显滞后, 产量达最大值之前, 两者的变化趋势基本一致, 也就是说, PAL活性的升高相应地带来红厚壳素产量的升高。

2 真菌诱导子对PAL活性和红厚壳素产量的影响

从图2可见: (1) 胡桐细胞悬浮培养期间不同时刻加入真菌诱导子后, PAL活性均迅速升高, 24 h时出现一个短暂的峰值, 然后缓慢下降, 培养至96 h的PAL活性下降, 与不加诱导子的相当。3种情况下的PAL活性峰值以培养18 d时加入的增幅最大, 实验开始时加入的次之, 9 d加入的最小。这说明植物细胞感受外界刺激后, 调节内部代谢能力与细胞所处的生长阶段有关。(2) 在诱导子作用下, 红厚壳素产量均有提高, 合成速度也快, 3者均在诱导培养72 h时出现明显的峰值, 增长幅度以18 d时加入的最大, 96 h的

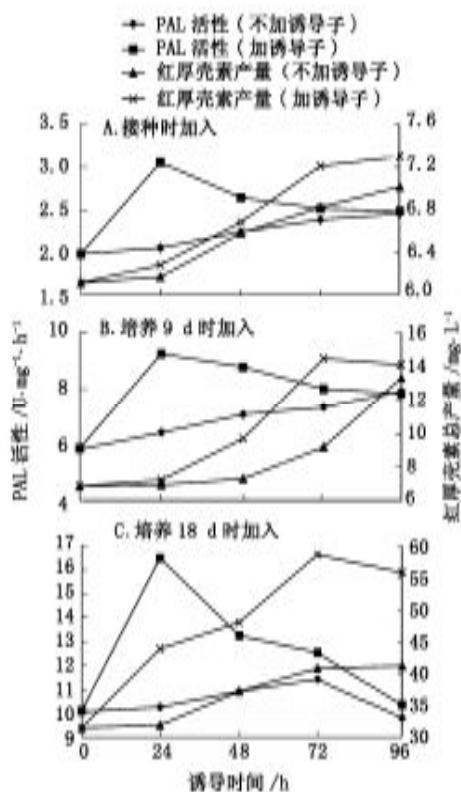


图2 培养后不同时间内加入真菌诱导子对PAL活性和红厚壳素产量的影响

Fig. 2 The influence of added fungi elicitor at different times on PAL activity and inophyllums production during the cell culture

虽略有下降,但仍比不加诱导物的明显高。开始时加入真菌诱导子后72 h的红厚壳素产量达到一定高值之后,仍缓慢升高。这显示PAL活性上升与红厚壳素产量增加之间似有一定的相关性。

3 PAL活性抑制物对红厚壳素含量的影响

图3表明,加入抑制物L-2-氨基-3-苯丙酸后,PAL活性下降。同时加入抑制物与诱导子时,PAL活性在单加诱导子与不加诱导子之间,24 h出现短暂峰值,之后缓慢下降;红厚壳素积累量也在两者之间。

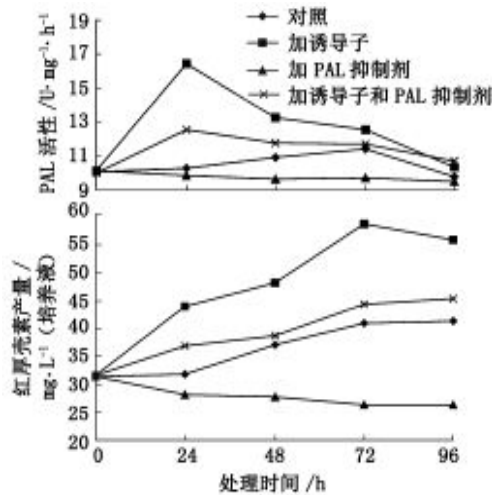


图3 PAL抑制物对PAL活性和红厚壳素积累量的影响

Fig. 3 Effect of the PAL inhibitor on PAL activity and inophyllum yield in the elicitor-treated cell culture
PAL抑制剂的终浓度为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

讨 论

苯丙烷类代谢途径是植物次级代谢中一条重要的途径。这一途径中的莽草酸途径产生的莽草酸通过分酸、预苯酸经转氨作用生成苯丙氨酸后进入苯丙烷类代谢途径,苯丙烷类代谢可生成反式肉桂酸、香豆酸、阿魏酸、芥子酸等中间产物,进一步转化为香豆素、绿原酸,也可形成CoA酯,再进一步转化为类黄酮、木质素等^[7]。PAL是连接初级代谢和苯丙烷代谢、催化苯丙烷

类代谢第一步反应的酶,是苯丙烷类代谢的关键酶和限速酶,也是研究最多的酶。另外,香豆素是植物受侵染或胁迫而产生的一类低分子量抗微生物的植保素,它是苯丙烷类代谢直接或间接产物。据报道,香豆素等植保素的生物合成与PAL活性成正相关^[8]。Kitamura等^[9]和Bohlman等^[10]分别根据珊瑚菜和芸香细胞悬浮培养过程中PAL活性与其相应代谢产物量呈正相关的结果,推论PAL是呋喃香豆素生物合成的关键酶。本文中悬浮培养的胡桐细胞不同生长阶段的PAL均与红厚壳素产量呈明显的相关性,似乎也说明苯丙氨酸解氨酶是胡桐细胞形成红厚壳素过程中的重要酶。这显示从提高PAL活性来增加胡桐悬浮培养细胞中的红厚壳素产量是值得考虑和探讨的课题。

参考文献

- Buckheit Jr RW, White EL, Fliakas-Boltz V et al. Unique anti-human immunodeficiency virus activities of the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors calanolide A, costatolide, and dihydrocostatolide. *Antimicrob Agents chemoth*, 1999, 43:1827~1834
- Ptail AD, Freyer AJ, Drake SE et al. The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. *J Med Chem*, 1993, 36(26):4131~4138
- 方中达. 植物研究方法. 北京: 农业出版社, 1979. 83~143
- 上海市植物生理学会. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985
- Xu Z-Q, Kenneth JN, Weinberg DS. Quantification of (1)-calanolide A, a novel and naturally occurring anti-HIV agent, by high-performance liquid chromatography in plasma from rat, dog and human. *J Chromatogr*, 2000, 742: 267~275
- 王敬文, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究. I. 植物激素对甘薯块根植物苯丙氨酸解氨酶和肉桂酸羟化酶活性变化及其伴随性的影响. *植物生理学报*, 1981, 7(4): 373~379
- 欧阳光察, 薛应龙. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控. *植物生理学通讯*, 1988, 24(3): 9~16
- 薛应龙, 欧阳光察. 植物抗病的物质代谢基础. 见: 余叔文主编. *植物生理与分子生物学*. 北京: 科学出版社, 1992
- Kitamura Y, Ikenaga T, Ooe Y et al. Induction of furanocoumarin biosynthesis in *Glehnia littoralis* cell suspension cultures by elicitor treatment. *Phytochem*, 1998, 48(1):113~117
- Bohlmann J, Gibraltarskaya E, Eliert U. Elicitor induction of furanocoumarin biosynthetic pathway in cell cultures of *Ruta graveolens*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1995, 43:155~161