

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201602007

引文格式: 蒋旋娴,李永成. L-丙氨酸对海南粗榧悬浮细胞合成三尖杉酯类碱的影响 [J]. 广西植物, 2017, 37(4):497-503

JIANG XX, LI YC. Improved cephalotaxine production of *Cephalotaxu mannii* suspension cells by L-alanine [J]. Guihaia, 2017, 37(4):497-503

L-丙氨酸对海南粗榧悬浮细胞合成三尖杉酯类碱的影响

蒋旋娴, 李永成*

(海南大学 食品学院, 海口 570228)

摘要: 该研究在海南粗榧悬浮细胞培养的不同阶段(5、10、15、20 d), 分别添加不同剂量的 L-丙氨酸(10、30、50、100 mg · L⁻¹), 测定细胞生长、细胞活力及产物含量, 确定 L-丙氨酸最佳的添加时间及添加剂量。结果表明: 添加 L-丙氨酸对细胞生长和细胞活力均有抑制作用; 在海南粗榧悬浮培养第 15 天、添加 30 mg · L⁻¹ L-丙氨酸时, 产物含量最高(4.853 6 mg · L⁻¹), 是对照(2.853 8 mg · L⁻¹) 的 1.7 倍。同时, 为了探讨添加 L-丙氨酸对海南粗榧悬浮细胞糖代谢的影响, 对培养基糖耗程度、细胞内糖酵解途径(glycolytic pathway, EMP 途径) 关键酶丙酮酸激酶(Pyruvate kinase, PK) 活力、磷酸戊糖途径(hexose monophosphate pathway, HMP 途径) 关键酶 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(glucose 6-phosphate dehydrogenase, G6PDH) 活力进行了测定, 结果显示添加 L-丙氨酸后, 植物细胞培养液中总耗糖速度与对照相比无明显差异, 丙酮酸激酶(PK) 活力与对照(25.37 U · g⁻¹) 相比下降了 29.10%, G6DPH 活力是对照组(53.49 U · g⁻¹) 的 1.33 倍。以上结果说明, 糖代谢途径中碳通量在一定程度上由 EMP 途径转向了 HMP 途径, 三尖杉酯类碱合成的前体物 PEP 积累, E4P 合成量增加, 均有利于产物三尖杉酯类碱含量的增加。

关键词: 海南粗榧, 悬浮培养, 抑制剂, L-丙氨酸, 三尖杉酯类碱

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)04-0497-08

Improved cephalotaxine production of *Cephalotaxu mannii* suspension cells by L-alanine

JIANG Xuan-Xian, LI Yong-Cheng*

(College of Food Science of Technology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: *Cephalotaxu mannii* is an indigenous plant to Hainan, China, which is the main material of cephalotaxu alkaloids. The cephalotaxu alkaloids are anti-cancer drugs which have been used widely in clinic. But *C. mannii* is rare. The plant suspension cell culture can increase the yield of secondary metabolites steadily. And some adopted strategies have been developed to increase the yield in plant cell culture, such as add metabolic inhibitor. L-alanine is an effective inhibitor of pyruvate kinase (PK), which is an important limited enzyme in the glycolytic pathway (EMP). To investigate the effects of L-alanine on suspension cell growth and the cephalotaxine production of *C. mannii*, different doses of L-alanine (10, 30, 50 and 100 mg · L⁻¹) were added into the *C. mannii* cells at different stages (10, 15, 20 and 25 d) of culture time. Then the cell growth, the cell activity and the cephalotaxine production were determined. The results showed that the cell growth and cell activity of *C. mannii* were inhibited after adding L-alanine, the cultures treated with 30 mg · L⁻¹ L-alanine at day 15 showed the highest cephalotaxine yield (4.853 6 mg · L⁻¹), which was 1.7 times

收稿日期: 2016-06-26 修回日期: 2016-08-08

基金项目: 国家自然科学基金(21166007) [Supported by the National Natural Science Foundation of China(21166007)].

作者简介: 蒋旋娴(1991-), 女, 湖北黄冈人, 硕士研究生, 研究方向为植物细胞工程, (E-mail) jiangxx1010@163.com.

*通信作者: 李永成, 博士, 副教授, 研究方向为发酵工程和植物细胞工程, (E-mail) lyc2360@sina.com.

that of the control cultures ($2.8538 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Then, the residue sucrose contents of the culture, the activity of pyruvate kinase (PK) which is the key enzyme of EMP pathway, the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) which is the key enzyme of hexose monophosphate pathway (HMP pathway) were all been determined to investigate the effects of L-alanine on cell glucose metabolism of *C. mannii*. The results showed that after adding L-alanine, the sucrose consumption rate of treated cells had no significant difference compared with the control cells, the PK activity of treated cells was decreased by 29.10% compared with the control cells ($25.37 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$), the G6PDH activity of treated cells was 1.33 times of that in the control cells ($53.49 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$). The results suggest that the carbon metabolic flux flow to HMP pathway from EMP pathway in some degree, so it can be presumed that the precursor PEP accumulated and the other precursor E4P also increased, which all benefit to the synthesis of cephalotaxine production.

Key words: *Cephalotaxus mannii*, suspension culture, inhibitor, L-alanine, cephalotaxine

海南粗榧(*Cephalotaxus mannii*)属于裸子植物门,为三尖杉科(粗榧科)三尖杉属(粗榧属)雌雄异株常绿乔木,是三尖杉科植物中分布最南的一种,主要分布在海南,但在广西、云南与西藏也有零星分布(傅立国,1978;陈焕镛,1964)。海南粗榧也是生产抗癌药物三尖杉酯碱(Harringtonine)和高三尖杉酯碱(Homoharringtonine)的主要材料(刘进平和党群帆,2006);由于有较强的抗癌作用,又被称为“抗癌奇木”(王有生,1990)。因为其繁殖不易,生长缓慢,并且近年来被过度采伐,这种国家二级重点保护植物已濒于灭绝的边缘(符文英等,2003)。三尖杉酯碱与高三尖杉酯碱在海南粗榧中的含量约为0.38%(树皮)(陈毓亨和黄全,1977),需要约1 000 kg的海南粗榧木材大约才能提取出1 g分析纯的三尖杉酯碱(刘进平等,2010),原料耗费巨大,远不能满足日益增长的临床需要。

植物细胞悬浮培养具有不受地理环境、土壤条件、季节变化等因素的限制,能确保产物均匀、连续的生产,并且提取方法简单(Gibson et al,1993)。其中,促进植物悬浮细胞高效表达次生代谢物的策略主要有:选育高通量的细胞系、选择合适的培养技术、优化培养条件、添加前体物质、使用诱导子和抑制剂等(Strohl,2001;Wilson & Roberts,2012)。其中添加代谢抑制剂可抑制支路代谢和切断其他非目的代谢的合成途径,改变细胞中代谢流的流向,从而增加目标化合物产量。周忠强和梅兴国(2004)在红豆杉悬浮细胞体系中通过单独或组合添加的方式添加单萜合成抑制剂樟脑、松油醇、 α -蒎烯后均能促进产物合成,并且三种抑制剂同时添加时更有利于产物的合成。

三尖杉类生物碱是异喹啉生物碱中一组结构特殊的生物碱,其生物合成途径如图1所示,葡萄糖经

过糖酵解产生磷酸烯醇式丙酮酸和磷酸戊糖途径产生的赤藓糖-4-磷酸,二者合成的莽草酸进一步转化为苯丙氨酸和酪氨酸,从而合成三尖杉酯类碱(Git-terman et al,1980;Parry et al,1980)。L-丙氨酸是糖酵解途径中重要的限速酶丙酮酸激酶的抑制剂。Ruifang et al(2009)报道在产林可霉素菌株的培养基中外源添加 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ L-丙氨酸后,产物含量增加13%。本研究期望通过添加L-丙氨酸,抑制丙酮酸激酶活性,阻断前体物磷酸烯醇式丙酮酸向丙酮酸的转化路径,促进葡萄糖向磷酸戊糖途径分流,使代谢流更多地流向所需产物合成的方向。

1 材料与方法

1.1 植物材料

海南粗榧(*Cephalotaxus mannii*)外植体采自海南省儋州市热带植物园,愈伤组织从其嫩叶中诱导获得(王成韬,2013)。

1.2 植物细胞培养

基础培养基为MS培养基,其中添加 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 萘乙酸、 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 激动素、 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 聚乙烯吡咯烷酮、 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酶水解酪蛋白以及 $35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、固体培养基中另外添加 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 植物凝胶。用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH调节pH至5.8~6.0(王成韬,2013)。

海南粗榧愈伤组织在 $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养,每1个月传代1次。取500 mL三角瓶装100 mL液体培养基,接种8 g愈伤组织作为种子液,黑暗培养,转速 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,温度 $(27 \pm 1) \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。种子液在使用前传代三次,每12 d传一代。接种时,用250 mL三角瓶装80 mL液体,接种上述培养三代的植物细胞悬浮培养细胞约6 g。

1.3 代谢抑制剂的制备与试验设计

L-丙氨酸溶解于0.1% NaOH溶液中,使用前

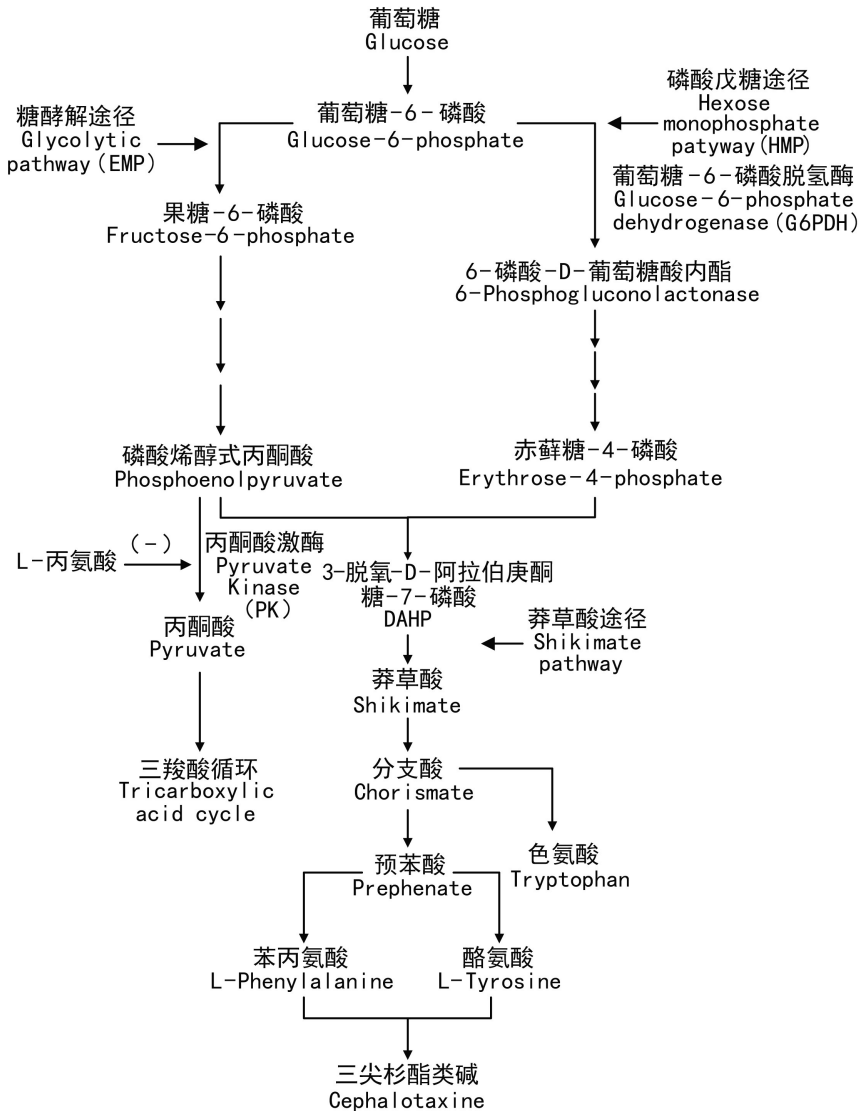


图 1 三尖杉酯类碱的生物合成途径 (Gitterman et al,1980; Parry et al,1980)

Fig. 1 Schematic illustration of biosynthetic pathway of cephalotaxine

121 ℃ 高温灭菌 15 min。在海南粗榧悬浮细胞培养第 15 天,添加 L-丙氨酸溶液,使 L-丙氨酸在培养基中终浓度为 10、30、50 和 100 mg · L⁻¹,对照组中不添加,每个浓度设 3 个平行。测定细胞生物量、细胞活力、三尖杉酯类碱含量,确定合成三尖杉酯类碱的最佳浓度。分别在海南粗榧悬浮细胞培养第 5、10、15、20 天添加最佳浓度的 L-丙氨酸溶液,对照组中不添加,每个处理设 3 个平行。测定细胞生物量、细胞活力、三尖杉酯类碱含量,确定其最佳添加时间。在上述结果中最佳添加时间向海南粗榧悬浮细胞培养体系中添加最佳剂量的 L-丙氨酸溶液,在加入 L-丙氨酸后每隔 3 d 取样测定培养液糖耗值,并在添

加 L-丙氨酸后 48 h,取样测定海南粗榧悬浮细胞胞内丙酮酸激酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶活力。

1.4 细胞活力的测定

用氯化三苯四氮唑 (2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride, TTC) 还原法测定。离心去上清液获得约 200 mg 新鲜植物细胞,加入 3 mL TTC 溶液(取 0.6 g TTC 溶于 100 mL pH 7.5 的 0.5 mmol · L⁻¹ 磷酸缓冲液中),25 ℃ 下反应 24 h,吸去 TTC,用蒸馏水清洗 2~3 次,收集细胞;加入 3 mL 95% 无水乙醇于 60 ℃ 恒温水浴 10 min,以抽提酶反应生成的红色甲臜,离心取上清液,冷却,于 492 nm 处测定其吸光值。细胞活力单位用每克湿细胞在 492 nm 处的吸光值来

表示($\text{OD} \cdot \text{g}^{-1}$)(DuBois et al,1956)。

1.5 培养液糖浓度测定

用苯酚-硫酸法测定悬浮培养培养基中残糖含量,即离心获得 1 mL 培养基上清液样品加 1 mL 5% (W/V)的苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸,混匀后在室温下反应 30 min,以葡萄糖标准液做标准曲线,在 480 nm 下测定其吸光度(Dacie et al,1992)。

1.6 丙酮酸激酶活力测定

(1)酶的提取:提取缓冲液组成为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH7.5; $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 巯基乙醇, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 10% 甘油, 1% (w/v) 不溶性 PVP。先取 200 mg 左右的湿细胞,加 1 mL 提取缓冲液与少量石英砂,冰上研磨匀浆,然后在 $15\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取上清液待测。(2)酶活测定:测定液组成为 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bis-tris-propane 或 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mes-HCl, pH 6.5, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PEP, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ADP, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADH, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 5% PEG(8000), $2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 兔肌乳酸脱氢酶,测定液 1.5 mL,酶提取液 0.5 mL。加酶后立即测定 OD_{340} , 1 min 后测定 OD_{340} 。以 1 min 内消耗 $1 \mu\text{mol}$ NAD^+ 所需的酶量定义为一个单位(U)。细胞酶活性用每克湿细胞的酶单位($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)来表示(Dacie,1984)。

1.7 G6PDH 活力测定

(1)酶的提取:提取缓冲液组成为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.5, $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 1% (w/v) PVP。先取 200 mg 左右的湿细胞,加 1 mL 提取缓冲液与少量石英砂,冰上研磨匀浆,然后在 $15\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取上清液待测。(2)酶活测定:测定液组成为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH7.5, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-磷酸葡萄糖二钠盐, $100 \mu\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADP-Na_2 。1.9 mL 测定液,加 0.1 mL 酶提取液, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 5 min,测定反应前后 OD_{340} 的变化。空白对照以 0.1 mL Tris-HCl 代替。以反应前后每 5 min 吸光度变化 0.01 所需的酶量定义为一个单位(U)。细胞酶活性用每克湿细胞的酶单位($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)来表示(Yu et al,2004)。

1.8 三尖杉酯类碱的提取与测定

(1)胞内产物提取:抽滤收集湿细胞, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 下干燥,加石英砂在钵中研磨,20 mL 甲醇浸泡 24 h,在真空条件下浓缩至干,最后用 1 mL 甲醇复溶,并用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤待测。(2)胞外产物提取:加氨水调节培养液 pH 至 8.0 左右,用三氯甲烷反复萃

取 3 次,在真空条件下浓缩至干,最后用 1 mL 甲醇复溶,并用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤待测。(3)测定:采用高效液相色谱法(HPLC),色谱条件为 XDBC18(150 nm \times 4.6 nm, $5 \mu\text{m}$) 色谱柱,进样量 $10 \mu\text{L}$,流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,流动相为 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵:甲醇 = 55:45,柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$,检测波长为 280 nm(Li,2014)。

1.9 统计分析

每个处理重复 3 次,实验数据用平均值 \pm 标准偏差表示。差异显著性分析用 Duncan 法进行多重比较, $P < 0.05$ 视为差异显著。

2 结果与分析

2.1 L-丙氨酸对海南粗榧悬浮细胞生长的影响

糖酵解是葡萄糖代谢的主要途径,为细胞生长提供所需的能量,L-丙氨酸是糖酵解途径的抑制剂,理论上添加 L-丙氨酸会抑制细胞的生长。如图 2:a 所示,细胞生物量随 L-丙氨酸添加剂量的增加呈下降趋势,随抑制剂浓度的增加,抑制作用增强。在添加时间方面(图 2:b),在不同生长时期添加 L-丙氨酸对细胞生长抑制作用不同,对细胞生物量的影响随 L-丙氨酸添加时间的延后而减弱,第 5 天添加 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-丙氨酸时,生物量比对照($22.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)降低 41.12%。综上所述,L-丙氨酸对悬浮细胞生长的抑制作用是随着其浓度的增大而增大。在培养后期添加,由于细胞生长已趋于稳定,因此对细胞生长影响并不明显。

2.2 L-丙氨酸对海南粗榧悬浮细胞活力的影响

如图 3:a 所示,添加不同浓度 L-丙氨酸后,海南粗榧细胞活力均受到抑制,随着 L-丙氨酸添加浓度增加,抑制作用逐渐加强,在添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-丙氨酸时,对细胞活力抑制作用最大。在悬浮细胞不同生长时期添加 L-丙氨酸如图 3:b 所示,在第 5 天添加,对细胞活力的抑制作用最为明显。说明添加过量抑制剂或者过早添加都会对植物细胞的初生代谢有伤害作用。

2.3 L-丙氨酸对三尖杉酯类碱合成的影响

分别测定海南粗榧中含量较高的三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱。由实验结果可知,添加不同剂量的 L-丙氨酸均能促进三尖杉酯类碱的合成,并且三尖杉酯类碱总量与对照相比均差异显著($P < 0.05$),其中添加 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 L-丙氨酸可有效促进三尖杉酯碱的合成。添加时间方面(表 2),15 d 添加效果最

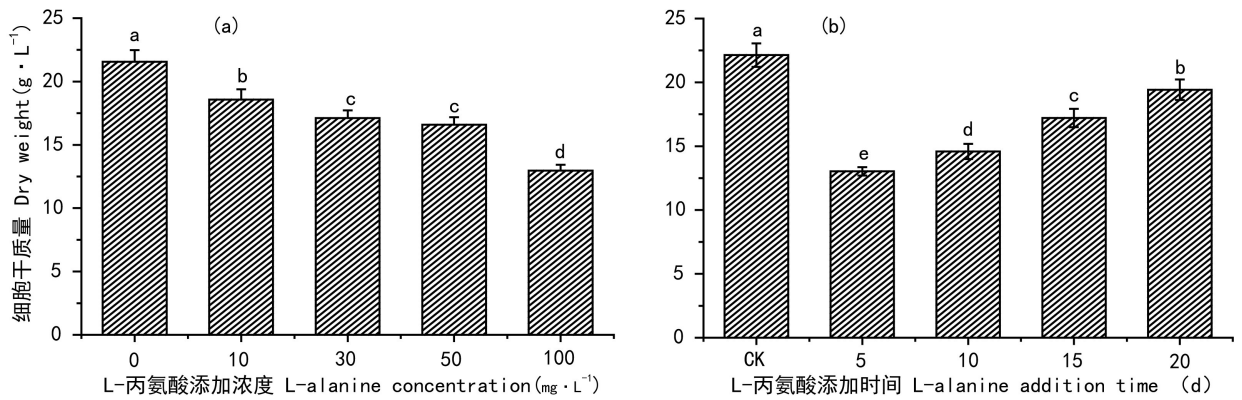


图2 L-丙氨酸添加剂量(a)与添加时间(b)对细胞生物量的影响 不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 2 Effects of L-alanine amount (a) and its addition time (b) on cell growth of *cephalotaxus mannii* cells Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

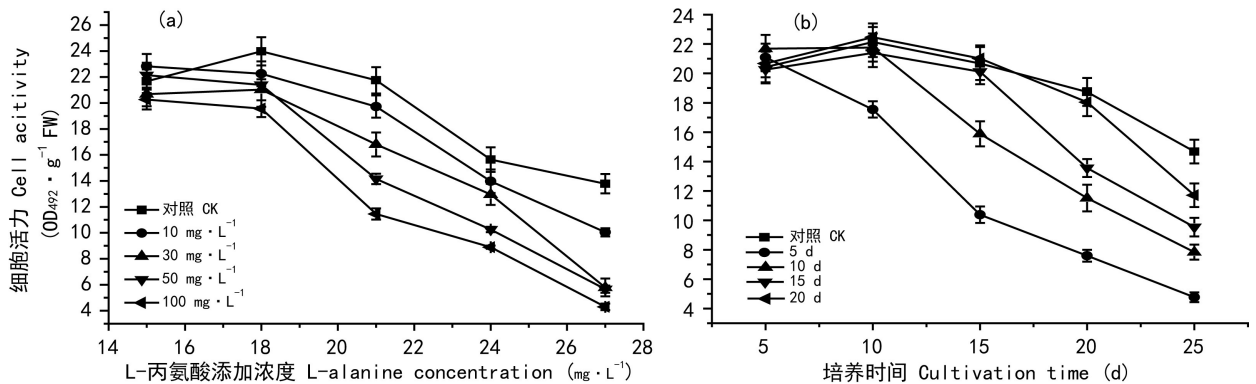


图3 L-丙氨酸不同添加剂量(a)与培养时间(b)对细胞活力的影响

Fig. 3 Effects of L-alanine cultivation (a) and L-alanine addition time (b) on the cell viability of *cephalotaxus mannii*

佳。表2结果表明,在第15天添加 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-丙氨酸时,产物含量达到最高,获得最佳产量的三尖杉酯类碱($4.8536 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),比对照组中三尖杉酯类碱含量($2.8538 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)高1.7倍。

2.4 L-丙氨酸对海南粗榧悬浮细胞糖代谢的影响

2.4.1 L-丙氨酸对海南粗榧悬浮细胞培养基糖耗程度的影响 添加L-丙氨酸后,培养基糖耗如图4所示,在添加抑制剂后的第0天到第6天,植物细胞糖耗受到抑制最为显著。在添加L-丙氨酸后第6天,培养基中残余总糖含量为 $12.62 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,其平均耗糖速度与对照 $[1.67 \text{ mg} \cdot (\text{mL} \cdot \text{d})^{-1}]$ 相比下降了42.04%。但在接下来的6d内,经处理后细胞的糖耗速度与对照相比显著增加,最终,经抑制剂处理后的培养基内残糖含量与对照相比不显著($P > 0.05$)。

虽然添加L-丙氨酸后,细胞活性不同程度的出现了下降现象,但植物细胞培养液中,其糖耗速度并没降低。这说明营养物质可能从维持细胞生长的初生代谢转向次生代谢。

2.4.2 L-丙氨酸对海南粗榧悬浮细胞丙酮酸激酶(PK)活力的影响 因为L-丙氨酸是通过抑制丙酮酸激酶的活性来抑制EMP途径,调节海南粗榧悬浮细胞糖代谢,所以测定丙酮酸激酶活力研究其抑制效果。图5显示,添加抑制剂后,丙酮酸激酶活性明显受到抑制($P < 0.05$),与对照($25.37 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)相比下降了29.10%。这表明添加L-丙氨酸后糖酵解途径中磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)转化为丙酮酸路径受到抑制,得合成产物三尖杉酯类碱的前体物PEP积累。

表 1 L-丙氨酸不同添加剂量对产物合成的影响
Table 1 Effects of L-alanine amount on product synthesis of *Cephalotaxus mannii* cells

处理 Treatment	产物 Production (mg · L ⁻¹)		
	三尖杉酯碱 Harringtonine	高三尖杉酯碱 Homoharringtonine	总产量 Total producton
空白对照 CK	(2.259 9 ± 0.041 2)d	(0.593 9 ± 0.067 7)e	(2.853 8 ± 0.108 9)e
10 mg · L ⁻¹ L-丙氨酸 10 mg · L ⁻¹ L-alanine	(2.829 6 ± 0.029 7)b	(1.355 1 ± 0.064 5)b	(4.184 7 ± 0.094 2)b
30 mg · L ⁻¹ L-丙氨酸 30 mg · L ⁻¹ L-alanine	(3.397 7 ± 0.081 2)a	(1.455 9 ± 0.084 3)a	(4.853 6 ± 0.165 5)a
50 mg · L ⁻¹ L-丙氨酸 50 mg · L ⁻¹ L-alanine	(2.620 9 ± 0.095 0)c	(1.210 1 ± 0.031 3)c	(3.831 0 ± 0.126 3)c
100 mg · L ⁻¹ L-丙氨酸 100 mg · L ⁻¹ L-alanine	(2.628 3 ± 0.080 5)c	(1.032 1 ± 0.072 5)d	(3.660 4 ± 0.153 0)d

表 2 L-丙氨酸不同添加时间对产物合成的影响
Table 2 Effects of L-alanine addition time on product synthesis of *Cephalotaxus mannii* cells

处理 Treatment	产物 Production(mg · L ⁻¹)		
	三尖杉酯碱 Harringtonine	高三尖杉酯碱 Homoharringtonine	总产量 Total producton
对照 CK	(2.259 9 ± 0.041 2)e	(0.593 9 ± 0.067 7)e	(2.853 8 ± 0.108 9)e
5 d	(2.433 5 ± 0.080 2)d	(0.860 0 ± 0.076 9)d	(3.293 5 ± 0.157 1)d
10 d	(3.198 0 ± 0.058 3)c	(1.291 1 ± 0.067 2)b	(4.489 1 ± 0.125 5)bc
15 d	(3.397 7 ± 0.081 2)b	(1.455 9 ± 0.084 3)a	(4.853 6 ± 0.165 5)a
20 d	(3.497 9 ± 0.058 1)a	(1.022 9 ± 0.067 3)c	(4.520 8 ± 0.125 4)b

2.4.3 L-丙氨酸对 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)活力的影响 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (glucose 6-phosphate dehydrogenase, G6PDH) 是糖代谢另一条重要途径磷酸戊糖途径(HMP)的关键酶,该途径终产物赤藓糖-4-磷酸(E4P)是三尖杉酯类碱合成的另一重要前体物。如图 6 所示,在添加 L-丙氨酸 48 h 后,G6DPH 活力明显高于对照组 ($P < 0.05$),是对照组 G6PDH 酶活力 ($53.49 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$) 的 1.33 倍。说明糖代谢途径中碳通量在一定程度上由 EMP 途径转向了 HMP 途径,并且三尖杉酯类碱合成的前体物 PEP 积累,E4P 合成量增加。

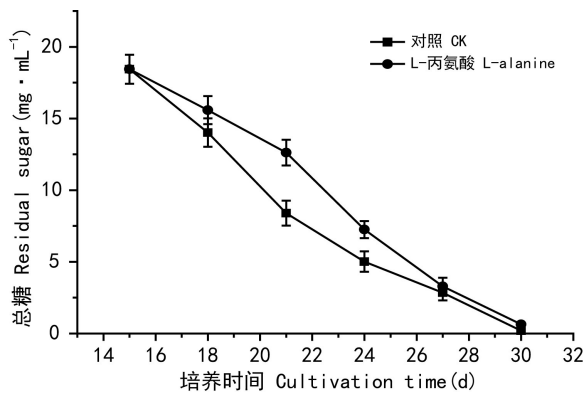


图 4 L-丙氨酸对植物细胞悬浮培养液的糖耗的影响
Fig. 4 Effects of L-alanine and its derivatives on the depletion curve of sugar of *Cephalotaxus mannii* cultures

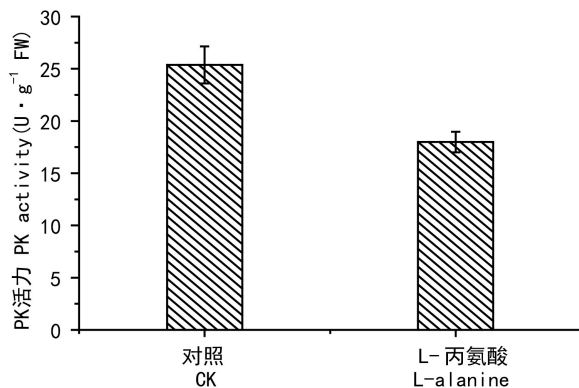


图 5 L-丙氨酸对海南粗榧悬浮细胞 PK 酶活力的影响
Fig. 5 Effects of L-alanine on PK activity of *cephalotaxus mannii* cells

3 讨论与结论

近年来,对提高三尖杉酯类碱合成的研究中,较多采用的方法为添加诱导子(茉莉酸甲酯、水杨酸等)、前体物(苯丙氨酸,酪氨酸),优化激素水平等(龙晓娟和李永成,2015;白雪芳等,1999;蔡长福,2007),以上方法均可在一定程度上促进三尖杉酯类碱的合成。本研究主要通过添加代谢抑制剂,调节糖代谢途径,从而增加产物生物碱的产量。

使用抑制代谢旁路或相关代谢途径的抑制剂后,可以使得代谢流更多地流向目标产物(董娟娥等,2009)。L-丙氨酸对海南粗榧产生的作用主要是

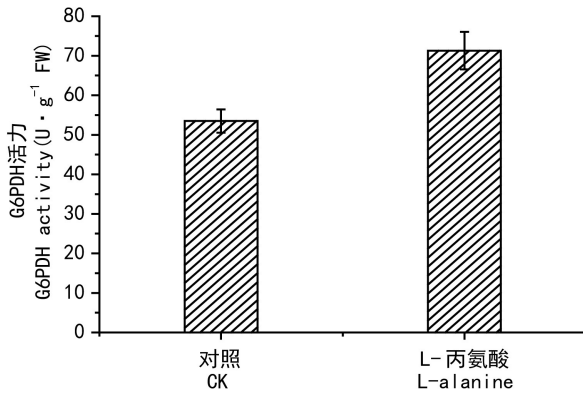


图 6 L-丙氨酸对植物细胞 G6PDH 酶活力的影响
Fig. 6 Effects of L-alanine on the G6PDH activity of *Cephilotaxus mannii* cells

通过抑制糖酵解途径中关键酶丙酮酸激酶活性改变其代谢流,刺激次生代谢产物的合成。研究表明,添加一定剂量的 L-丙氨酸对海南粗榧产三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱都有一定的促进作用。

本研究在细胞生长方面,L-丙氨酸对细胞生长和细胞活力都有不同程度的抑制作用,并且随添加浓度的增加抑制作用增强。这是由于抑制糖酵解途径,在一定程度上会影响细胞能量的供给,抑制细胞初生代谢。添加过量的抑制剂会因为三羧酸循环中缺乏碳流,导致细胞缺失能量,所以选择合适的添加剂量非常重要。另外,第 15 天加入抑制剂时,细胞生长趋于稳定期(陈林和李永成,2014),此时细胞生长趋于稳定,次生代谢能力强,可在一定程度上抵御外界刺激,对细胞的生长与细胞活力抑制作用较小,有利于三尖杉酯类碱的合成。

本研究由三尖杉酯类碱合成途径得知,由糖酵解途径(EMP)产生的磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和磷酸戊糖途径(HMP)产生的 4-磷酸赤藓糖(E4P)是产物合成的限制性底物。在 EMP 途径中,PK 催化 PEP 转化为丙酮酸。加入 PK 抑制剂 L-丙氨酸后,PK 活力与对照相比有所下降,这种转化作用受到抑制,前体物 PEP 积累。G6DPH 是磷酸戊糖途径的限速酶,添加 L-丙氨酸后,G6DPH 活力高于对照,HMP 途径碳通量增加,E4P 含量升高。并且,在添加抑制剂后,海南粗榧悬浮细胞耗糖与对照相比有一个先减慢后加快的趋势,最终在海南粗榧悬浮细胞生长后期,经抑制剂处理后的培养基内残糖含量与对照无显著差异。所以说,抑制了丙酮酸激酶

活性后,改变了代谢流,使三尖杉酯类碱前体物 PEP 积累,E4P 含量增加,二者缩合形成 DAHP,代谢流在一定程度上被导向了莽草酸途径,有利于三尖杉酯类碱的生物合成。

综上所述,在海南粗榧悬浮细胞培养第 15 天添加代谢抑制剂 30 mg · L⁻¹ L-丙氨酸对海南粗榧产三尖杉酯类碱和高三尖杉酯类碱有较好的促进作用。

参考文献:

- BAI XF, WANG JM, BU CS, et al, 1999. Production of antitumor-alkaloids from suspension cell culture of *Cephilotaxus fortunei* [J]. *Chin J Biochem Pharm*, 20: 139-142. [白雪芳,王靖楣,卜宗式,1999.三尖杉悬浮细胞的培养及抗癌生物碱的产生[J].*中国生化药物杂志*, 20: 139-142.]
- CAI CF, 2007. The study of cell culture and metabolize of *Cephilotaxus* alkaloids of *Cephilotaxus fortunei* Hook.f. [C]. *FuJian: Fujian Agriculture and Forestry University*; 43. [蔡长福,2007.三尖杉细胞培养及其三尖杉酯类碱次生代谢的研究[C].福建:福建农林大学,43.]
- CHEN HY, 1964. *Flora of Hainan*; Vol. 1 [M]. Beijing: Science Press; 220. [陈焕镛,1964.海南植物志:第 1 卷[M].北京:科学出版社,1964: 220]
- CHENG L, LI YC, 2014. Establishment of cell suspension culture system for *Cephilotaxus mannii* [J]. *Guangdong Agric Sci*, 9 (24): 54-59. [陈林,李永成,2014.海南粗榧细胞悬浮培养体系的建立[J].*广东农业科学*, 9(24): 54-59.]
- CHENG YH, HUANG Q, 1977. The resource utilization of Anticancer plant *Cephilotaxu mannii* in our country [J]. *Chin Herb Med*, 6: 14-17. [陈毓亨,黄全,1977.我国抗癌植物—三尖杉的资源利用[J].*中草药通讯*, 6: 14-17.]
- DONG JE, ZHANG KJ, LIANG ZS, 2009. Plant secondary metabolism and its regulation [M]. *Yangling: North West Agriculture and Forestry University Press*; 147. [董娟娥,张康健,梁宗锁,2009.植物次生代谢与调控[M].西北农林科技大学出版社: 147.]
- DUBOIS M, GILLES K, HAMILTON, et al, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 28(3): 350-356.
- FU LG, 1978. *China higher plants*; Vol. 7 [M]. Beijing: Science Press. [傅立国,1978.中国高等植物:第 7 卷[M].北京:科学出版社,1978.]
- FU WY, DU DL, XING YW, 2003. Study on the protection and exploitation of *Cephilotaxus mannii* [J]. *Mol Plant Breed*, 5(6): 795-799. [符文英,杜道林,邢诒旺,2003.海南粗榧保护和开发利用的研究[J].*分子植物育种*, 5(6): 795-799.]
- GIBSON DM, KETCHUM REB, VANCE NC, et al, 1993. Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* [J]. *Plant Cell Rep*, 12: 479-482.
- GITTERMAN A, PARRY RJ, DUFRESNE RF, et al, 1980. Biosynthesis of the cephalotaxus alkaloids. Investigations of the biosynthesis of deoxyharringtonine, isoharringtonine, and harringtonine [J]. *J Amer Chem Soc*, 102(6): 2074-2081.
- IBORRA JL, GUARDIOLA J, MONTANER S, et al, 1992. 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for immobilized (下转第 425 页 Continue on page 425)