

黑曲霉真菌诱导子对喜树培养细胞喜树碱积累的影响

潘学武^{1,2}, 董妍玲², 石亚亚³

(1. 武汉生物工程学院 生物工程系, 湖北 武汉 430415; 2. 武汉生物工程学院 生物技术系 湖北 武汉 430415;

3. 武汉大学 生命科学学院 植物发育生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要:以黑曲霉提取物作为真菌诱导子, 研究其对提高喜树悬浮培养细胞的生长和喜树碱产量的影响。结果表明: 终浓度 40 mg/L 的诱导子在细胞培养的第 14 天加入, 细胞干重在第 26 天达到最大量 31.5 g/L, 是未处理的细胞干重的 1.2 倍; 喜树碱产量在第 29 天达到最大值 13.6 mg/L, 是对照产量的 6.0 倍, 没有受到诱导处理的细胞干重和喜树碱产量都在第 20 天达到最大值。与真菌诱导子刺激提高细胞生长和喜树碱生物合成相对应的是, 诱导刺激的培养细胞表现出较高的细胞活力, 培养基中糖类的消耗量也随之增加。

关键词:真菌诱导子; 喜树; 喜树碱; 黑曲霉; 植物细胞培养

中图分类号: S 792 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)20-0156-04

喜树碱(Camptothecin)是 1966 年首次在我国特有的珙桐科植物喜树(*Camptotheca acuminata* Decaisne)中发现的抗肿瘤活性物质^[1]。在随后的研究揭示, 喜树碱的独特抗癌机理是由于其抑制肿瘤细胞内拓扑异构酶的活性而具有细胞毒性效应的^[2]。喜树碱的 2 种衍生物 Irinotecan 和 Topotecan 已于 1996 年得到美国 FDA 的批准用于临床, 其它的如 9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、Exatecan (DX-8951f)、Lurtotecan (GG-211)等正处于各级临床试验, 不久将陆续上市^[3]。所有的衍生物都以喜树碱为原料而合成的, 据估计^[4], 喜树碱类药物全球年销售额大约是 10 亿美元。随着喜树碱类药物临床需求的不断扩大, 可持续获得喜树碱及其衍生物已成为研究的主攻方向之一。目前喜树碱唯一可行的市场来源仍然是从野生植物(主要是喜树)中提取, 单纯靠从植株中提取势必造成对自然资源和生态环境的巨大破坏, 也无法满足市场的需求, 利用植物细胞培养法生产喜树碱及其衍生物被认为是一条很有希望的替代途径^[3,7]。

由于生物和非生物诱导子在植物细胞培养中生产次生产物时具有重要的调控作用, 特别是真菌诱导子(Fungal elicitor)在植物与真菌的相互作用中, 能快速、高

度专一和选择性地诱导植物特定基因的表达, 进而活化特定的次生代谢途径, 积累目标代谢产物^[8,9]。因此, 利用真菌诱导子刺激植物组织提高次生代谢物产量的研究一直是个热点^[8-12]。黑曲霉(*Aspergillus niger*)是自然界普遍存在的一种真菌, 其菌丝提取物作为一种常见的真菌诱导子, 已广泛应用于植物细胞培养中来刺激提高次生代谢产物的产量, 并取得了良好的效果^[9-14]。为此, 该研究旨在喜树悬浮培养中添加黑曲霉的菌丝体提取物作为诱导子, 来促进喜树碱的生物合成。

1 材料与方法

1.1 试验材料

喜树悬浮细胞系为课题组长期培养而来的一个普通细胞系, 详细报道请参见文献[6-7]。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养 悬浮培养以 MS 作为基本培养基, 添加激素 2,4-D 0.1 mg/L, NAA 0.5 mg/L 和 6-BA 0.5 mg/L, 蔗糖 40 g/L, pH 5.8。250 mL 三角瓶置于转速 100 r/min 的摇床上, 25℃温室中黑暗培养。每瓶加入 100 mL 液体培养基, 121℃高压灭菌 15 min, 每个处理接种 3 瓶, 每瓶接种新鲜细胞 10 g, 细胞培养到第 20 天时收获(特别说明除外)。

1.2.2 真菌诱导子的影响 黑曲霉真菌诱导子来自于华中科技大学生命科学与技术学院, 真菌的培养与诱导子的制备详细过程请参见文献[10]。诱导子的加入量按制备液中的含糖量表示, 单位为 mg/L, 糖含量的测定采用硫酸-苯酚法, 试验时加入到所需的最终浓度, 对照加入同样体积的无菌水。

第一作者简介: 潘学武(1975-), 男, 湖北恩施人, 博士, 讲师, 现主要从事植物细胞工程的研究工作。E-mail: xuewupan@sina.com。
通讯作者: 董妍玲(1977-), 女, 山东德州人, 博士, 讲师, 现主要从事基因工程方面的教学与科研工作。E-mail: shoongyanling@163.com。

基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目(2006ABA323); 武汉大学博士后研究基金资助项目[2008(205-180516)]。

收稿日期: 2010-06-30

1.2.3 细胞生长速率的测定 待测的细胞通过真空抽滤将培养液与细胞分开,收获细胞于真空冷冻干燥箱中干燥至恒重后称重,生长速率以每升培养液产生的细胞干重(g/L)来表示。

1.2.4 喜树碱产量的测定 细胞样品中喜树碱的提取和检测采用高效液相色谱(HPLC)分析的方法^[9]。培养液中喜树碱释放量的测定方法如下:新鲜细胞经抽滤与培养液分开后,取10 mL培养液加入10 mL氯仿充分振荡,吸出氯仿层,重复上述过程3次。合并氯仿层成结晶,在结晶物中加2 mL氯仿与水(体积比为8:2)萃取3次,合并氯仿层成结晶,结晶物用1 mL的甲醇(色谱纯)溶解定容后用于HPLC分析,测定方法同上,喜树碱标准样品购自美国的Sigma公司,喜树碱的产量用每升培养基中产生的喜树碱总量(mg/L)来表示。

1.2.5 培养体系的生化分析 细胞活力的测定采用氯化三苯四氮唑(TTC)显色法,以活细胞数目占细胞总数的百分比来表示,培养基中的糖含量采用蒽酮—硫酸法测定。

1.3 重复性和数据处理

试验中各处理至少3次重复,文中的图片和表格中的数据为各处理的平均值±标准偏差。

2 结果与分析

2.1 不同浓度真菌诱导子的影响

在细胞培养至第18天时,加入不同终浓度黑曲霉真菌诱导子,细胞培养到第20天时收获。由表1可知,低浓度的真菌诱导子对细胞的生长有一定的刺激作用,当诱导子浓度大于40 mg/L时,细胞生长受到明显抑制。诱导子显著诱导细胞中喜树碱的合成,并促进产物向培养基中分泌。当加入浓度为40 mg/L时,喜树碱的总产量达到最大值8.7 mg/L,是没有受到诱导刺激的3.8倍,所以试验采用40 mg/L剂量的黑曲霉诱导子作进一步的研究。

表1 不同浓度的真菌诱导子对喜树细胞生长及喜树碱积累的影响

诱导子剂量 /mg·L ⁻¹	细胞干重 /g·L ⁻¹	细胞内喜 树碱产量 /mg·L ⁻¹	培养基中 喜树碱产量 /mg·L ⁻¹	喜树碱 总产量 /mg·L ⁻¹
0(CK)	26.5±0.9	2.3±0.2	0	2.3±0.2
20	29.0±2.1	7.3±0.4	1.0±0.1	8.3±0.4
40	27.4±0.9	7.4±0.3	1.3±0.1	8.7±0.2
60	24.3±1.6	5.2±0.5	2.1±0.2	7.3±0.5
80	22.1±1.3	4.0±0.3	2.7±0.1	6.7±0.2
100	21.5±1.4	3.4±0.1	2.1±0.2	5.5±0.3

2.2 真菌诱导子不同诱导时间的影响

以黑曲霉真菌提取液40 mg/L(终浓度)作为诱导子分别在细胞生长的不同阶段添加到培养基中,细胞培

养到第20天时收获,考察诱导子对细胞生长及喜树碱合成的影响。由表2可知,诱导子添加时间越早越有利于细胞的生长,但是对于喜树碱的合成而言,在生长的中后期(10~18 d)加入更有利于次生物质的产生。在细胞培养的第14天加入时,对喜树碱合成最有利,喜树碱产量可达到9.9 mg/L,是没有受到诱导刺激的4.1倍。

表2 真菌诱导子的加入时间对喜树细胞生长及喜树碱积累的影响

添加时间 /d	细胞干重 /g·L ⁻¹	细胞内喜树碱 产量/mg·L ⁻¹	培养基中喜树碱 产量/mg·L ⁻¹	喜树碱总量 /mg·L ⁻¹
0(CK)	25.9±0.8	2.4±0.4	0	2.4±0.1
2	31.1±1.9	4.2±0.3	0.6±0.2	4.8±0.4
6	32.1±1.3	4.7±0.5	1.0±0.1	5.7±0.4
10	29.3±1.3	7.2±0.4	1.4±0.1	8.6±0.5
14	28.5±1.0	8.4±0.5	1.5±0.1	9.9±0.5
18	27.4±0.9	7.4±0.3	1.3±0.1	8.7±0.2

2.3 真菌诱导子对细胞影响的动态变化规律

根据上述的结果,进一步研究了40 mg/L(终浓度)的真菌诱导子在14 d诱导处理后,细胞生长和喜树碱积累的动态变化规律(图1)。40 mg/L的黑曲霉提取物可以促进细胞干重的显著增加,在生长到第26天时达到最大,细胞干重为31.5 g/L,是未受到诱导处理的细胞干重最大值27.1 g/L(在细胞培养的第20天达到)的1.2倍。在细胞培养到第29天时,诱导子处理的细胞喜树碱产量达到最大值13.7 mg/L,是未受到诱导处理的培养细胞喜树碱产量最大值2.3 mg/L(在细胞培养的第20天达到)的6.0倍。

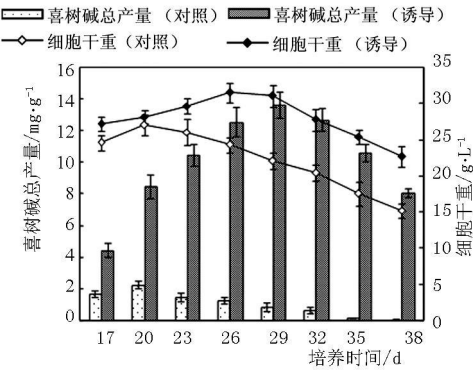


图1 真菌诱导子对喜树细胞生长和喜树碱生物合成影响的动态变化

2.4 真菌诱导子对细胞活力和蔗糖消耗的影响

根据上述的结果,进一步研究了40 mg/L(终浓度)的真菌诱导子在第14天诱导处理后,培养细胞的细胞活力和培养基中蔗糖的吸收消耗规律。由图2可知,未受到诱导处理的细胞活力在第23天达到最大值,随后逐步下降。受到诱导处理的细胞活力在开始几天内(17~20 d)无显著变化,并低于对照,但从培养的第20

天开始增加,到第26天细胞活力超过对照,第29天达到最高峰,然后开始下降。培养物对蔗糖的吸收利用规律表明,受到诱导处理的培养细胞在后来的生长过程中能持续地消耗利用蔗糖,而未受到刺激的培养细胞从第23天开始就几乎不再从培养基中吸收利用蔗糖。

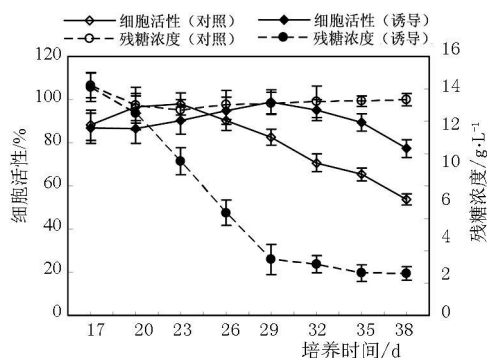


图2 真菌诱导子对喜树细胞活力和培养
基中蔗糖消耗的动态变化

3 结论与讨论

一直以来,真菌诱导子广泛应用于植物细胞培养中生产次生代谢产物,被认为是提高次生代谢产物产量的最有效途径之一。但是,诱导子在大幅度提高目标产物的同时也严重地抑制了细胞的生长^[9-10],这也是导致真菌诱导子难以在植物细胞大规模培养中广泛应用的限制性因素之一。从表1、2试验结果可看出,黑曲霉提取物作为诱导子在较低剂量浓度范围内(≤ 40 mg/L)可以显著提高悬浮培养细胞喜树碱的产量,同时也能促进细胞的生长。同样结果在(*Morinda elliptica*)和印度人参(*Withania somnifera*)的组织培养中也得到发现,黑曲霉真菌诱导子能在促进产物产量增加的同时也能促进细胞的生长^[12-14]。另外,在董芳等^[8]的研究中也发现,真菌诱导子可不同程度地促进春兰组培物生长量的增加。该试验中真菌诱导子除了作为诱导子功能外^[9-11],还能作为营养的功能^[8-12]。

另外,真菌诱导子处理时间的选择也是关键因素之一,诱导子在细胞培养的第14天加入最有效(表2)。不同的加入时间会得到不同的效果,这在众多研究中得到广泛证实。在虎杖(*Polygonum cuspidatum*)愈伤组织,黑曲霉诱导子在第0天加入,白藜芦醇含量最高^[9]。在红豆杉(*Taxus chinensis*)细胞培养的第12天或第15天加入黑曲霉诱导子,可以最有效促进紫杉醇的生物合成^[10]。但在长春花(*Catharanthus roseus*)细胞培养中,诱导子第20天加入^[11],在欧洲夹竹桃(*Nerium oleander*)细胞培养中,诱导子第25天处理^[13],才最有利于目的产物的合成。由此可看出,每种培养物都具有各自的特性,诱导刺激时间的选择至关重要。

细胞培养的动态研究结果表明,黑曲霉诱导子处理后的细胞活力低于对照,可能是因为细胞适应新环境而产生的防御反应^[10-11],随后细胞活力缓慢增加并超过对照,并能持续较长的时间(图2)。同时诱导子处理可以促进细胞利用更多的蔗糖来成就较高的生物量(图1、2),这与早期的研究相类似,即良好的喜树细胞生长状态(图1),有助于喜树碱的生物合成^[5-6]。

参考文献

- [1] Wall M E, Wani M C, Cooke C E, et al. Plant antitumor agents, the isolation and structure of camptothecin a novel alkaloidal leukaemia and tumor inhibitor from *camptotheca acuminata* [J]. Journal of the American Chemical Society, 1966(88): 3888-3890.
- [2] Hisang Y H, Herizberg R, Hecht S, et al. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1985(260): 14873-14878.
- [3] Sirkantaramas S, Asano T, Sudo H, et al. Camptothecin; therapeutic potential and biotechnology [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2007(8): 196-202.
- [4] Sudo H, Yamakawa T, Yamazaki M, et al. Bioreactor production of camptothecin by hairy root cultures of *Ophiorrhiza pumila* [J]. Biotechnology Letters, 2002, 24: 359-363.
- [5] Kim S H, Hur B K, Byun S Y. Effect of sugar concentration on camptothecin production in cell suspension cultures of *Camptotheca acuminata* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999(4): 277-280.
- [6] Pan X W, Shi Y Y, Liu X, et al. Influence of inorganic microelements on the production of camptothecin with suspension cultures of *Camptotheca acuminata* [J]. Plant Growth Regulation, 2004(44): 59-63.
- [7] Pan X W, Xu H H, Liu X, et al. Improvement of growth and camptothecin yield by altering nitrogen source supply in cell suspension cultures of *Camptotheca acuminata* [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26: 1745-1748.
- [8] 董芳, 赵建娜, 刘红霞. 真菌诱导子对春兰组培物生长的影响 [J]. 北方园艺, 2008(5): 194-196.
- [9] 文涛, 曾杨, 喻晓, 等. 真菌诱导子对虎杖愈伤组织中白藜芦醇合成的影响 [J]. 核农学报, 2008(22): 435-438.
- [10] WANG G WU J, MEI X. Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001(55): 404-410.
- [11] Namdeo A, Patil S, Fulzele D P. Influence of fungal elicitors on production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus* [J]. Biotechnology Progress, 2002(18): 159-162.
- [12] Chong T M, Abdullah M A, Lai O M, et al. Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture [J]. Process Biochemistry, 2005(40): 3397-3405.
- [13] Ibrahim A K, Khalifa S, Khafagi I, et al. Stimulation of oleandrin production by combined *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and fungal elicitation in *Nerium oleander* cell cultures [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007(41): 331-336.
- [14] Chaudhuri K, Das S, Bandyopadhyay M, et al. Transgenic mimicry of pathogen attack stimulates growth and secondary metabolite accumulation [J]. Transgenic Research, 2009(18): 121-134.

10%吡虫啉 WP 防治苹果黄蚜试验研究

刘花粉, 李俊霞, 单文荣

(河北工程大学 农学院 河北 邯郸 056021)

摘要: 用 10%吡虫啉 WP 4 000、5 000、6 000 倍进行苹果黄蚜试验。结果表明: 10%吡虫啉 WP 4 000、5 000 倍对苹果黄蚜 3 d 后的防效分别达 95.0%、90.0%; 7 d 后的防效分别达 99.2%、97.5%; 12 d 后的防效可达 95.1%、92.8%, 均高于目前常用农药的防效。显示 10%吡虫啉 WP 是一种高效、低毒且持效期长的优良内吸性杀虫剂, 建议生产上应用 5 000 倍左右的剂量防治苹果黄蚜。

关键词: 吡虫啉 WP; 苹果黄蚜; 防效

中图分类号: S 436.611.2⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)20-0159-02

苹果黄蚜(*Aphis spiraecola*)属同翅目、蚜科, 又名绣线菊蚜, 俗称腻虫、油汗。主要为害苹果、梨、沙果、海棠、木瓜等多种蔷薇科植物, 以若蚜、成蚜群集于苹果等寄主新梢、嫩芽或叶片背面及幼果表面, 被害叶常呈现褪绿色斑点, 后由叶尖向叶背横卷或卷缩, 严重时早期落叶, 造成树势衰弱。该虫 1 a 发生 10 余代, 6~7 月间繁殖最快, 产生大量有翅蚜扩散蔓延造成严重为害。

苹果黄蚜对有机磷和菊酯类常用单剂, 表现一定的

抗药性, 在盛发期喷药后由于防治不彻底, 数天后仍然会造成严重为害。为此, 需要找出一种高效、低毒的优良制剂, 以解决生产亟需。吡虫啉则是具有不同抗性机理的新型农药, 该试验旨在研究吡虫啉单剂的常用剂量对苹果黄蚜的田间防效, 为苹果黄蚜防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药剂及来源

10%吡虫啉 WP(石家庄化工厂生产提供); 40%氧化乐果 EC(市售)。

1.2 试验处理

将 10%吡虫啉 WP 配制成 4 000、5 000、6 000 倍 3

第一作者简介: 刘花粉(1965-), 女, 硕士, 副教授, 现从事植保教学与研究工作。E-mail: liuhuafen1965@sina.com。

收稿日期: 2010-07-19

Effects of *Aspergillus niger* as a Fungal Elicitor on Camptothecin Accumulation with Cell Cultures of *Camptotheca acuminata* Decaisne

PAN Xue-wu^{1,2}, DONG Yan-ling², SHI Ya-ya³

(1. Department of Bioengineering, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415; 2. Department of Biotechnology, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415; 3. Key Lab of MOE for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072)

Abstract: A fungal elicitor from *Aspergillus niger* could significantly stimulate cell growth and camptothecin biosynthesis with suspension cultures of *Camptotheca acuminata* Decaisne. When the elicitor at 40 mg/L of final concentration was supplemented with suspension cultures on the 14th day of growth, the highest dry cell weight (31.5 g/L) was achieved on the 26th day, recording about 1.2-folds increase over that of untreated cells. Maximum camptothecin yield (13.6 mg/L) was achieved on the 29th day, which was about 6.0-folds higher than that of the control. Maximum cell dry weight and camptothecin yield of unelicited cells were both obtained on day 20. Corresponding to the higher cell growth rate and increased alkaloids acuminata induced by the fungal elicitor, higher cell viability and enhanced consumption rates of sugar occurred in elicited cells during subsequent cell suspension subcultures of *C. acuminata*.

Key words: fungal elicitor; *Camptotheca acuminata* decaisne; camptothecin; *Aspergillus niger*; plant cell culture