

# 稀土元素铈对提高细胞培养喜树碱产量的研究

潘学武<sup>1,3</sup>, 董妍玲<sup>2</sup>, 石亚亚<sup>3</sup>, 许恒皓<sup>3</sup>

(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 生命科学院 植物发育教育部重点实验室, 湖北 武汉 430072)

**摘要:**在喜树悬浮培养细胞中,三价稀土铈( $Ce^{3+}$ )的诱导刺激能显著促进喜树碱的生物合成。在细胞培养的第10天加入0.1 mM的 $Ce^{3+}$ ,可使喜树碱产量达到最大值13.02 mg/L,是没有受到刺激的6.39倍。与此相应的是, $Ce^{3+}$ 刺激能显著提高培养细胞苯丙氨酸裂解酶的活性,增加细胞内丙二醛的含量。

**关键词:**稀土元素;喜树碱;铈;植物细胞培养

**中图分类号:**S 792.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)17-0091-03

喜树(*Camptotheca acuminata* Decaisne)为珙桐科喜树属植物,我国特有树种,国家二级保护植物。1966年,科学家首次发现喜树中含有抗肿瘤活性物质喜树碱(Camptothecin)<sup>[1]</sup>。直到1985年,研究结果进一步揭示,喜树碱是由于抑制肿瘤细胞内拓扑异构酶I(Topoisomerase I)的活性而具有抗癌活性的<sup>[2]</sup>,喜树和喜树碱才开始成为新的研究热点。1996年,喜树碱的2种衍生物,Irinotecan和Topotecan得到美国FDA的批准用于临床<sup>[3]</sup>。随着以喜树碱为原料开发的临床药物需求的不断扩大,可持续获得喜树碱及其衍生物已成当务之急。现在世界范围内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,然而,喜树野生资源毕竟有限,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,也不能满足市场的需要,利用植物细胞培养法生产喜树碱被认为是一条很有希望的替代途径<sup>[3-4]</sup>。

近十几年来,随着稀土资源的开发应用,使得稀土元素越来越成为生物工作者的关注研究对象。现已证明,适宜浓度的稀土能刺激植物生长,促进植物根系对养分的吸收,提高植物叶绿素含量,促进光合作用,促进开花和生殖以及抗逆性等<sup>[5]</sup>。许多研究人员将稀土作为非生物的诱导子,应用到植物组织培养领域,来刺激诱导次生代谢产物的积累,并取得了较好的结果<sup>[6]</sup>。在

诸多的稀土元素中,铈离子( $Ce^{3+}$ )被广泛应用来提高植物细胞培养物中目的产物的产量<sup>[7-10]</sup>。为此,现以喜树悬浮培养细胞为试验材料,研究了 $Ce^{3+}$ 对细胞生长及喜树碱生物合成的影响,并初步探讨其作用机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料和细胞培养

喜树悬浮细胞系为该研究小组从喜树诱导培养而来的1个普通细胞系<sup>[4]</sup>。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。

### 1.2 稀土铈的来源及配制方法

稀土铈采用氯化铈( $CeCl_3$ ) (购自于包头市亿源稀土有限责任公司),  $CeCl_3$ 试验前用蒸馏水(加少许 $HNO_3$ )配置成一定浓度的母液,过滤除菌,试验时加入至所需的浓度,对照加入同样体积的无菌水。

### 1.3 细胞生长速率的测定

将待测的悬浮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。

### 1.4 喜树碱含量的测定

细胞样品中喜树碱的提取和检测参照文献<sup>[4]</sup>的方法,喜树碱标准样品购自美国的Sigma公司,喜树碱的含量和产量分别用占悬浮培养细胞干重的比例和每升培养基中喜树细胞产生的喜树碱总量(mg/L)来表示。

### 1.5 培养液中喜树碱释放量的测定

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3次合并氯仿层成结晶,结晶物中加入2 mL氯仿与水(体积比为

第一作者简介:潘学武(1975-),男,湖北恩施人,博士,讲师,主要从事植物细胞工程的研究。

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科研工作。

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资助项目(2008(205-180516))。

收稿日期:2010-05-25

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)溶解定容后用于高效液相色谱(HPLC)分析,测定方法同上。

#### 1.6 苯丙氨酸裂解酶活力和丙二醛含量的测定

苯丙氨酸裂解酶(PAL)活性的测定参见文献[11],丙二醛(MDA)含量的测定参见文献[12]。

#### 1.7 重复性和数据处理

试验中各处理至少重复3次,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 不同浓度铈离子对喜树碱产量的影响

将 $Ce^{3+}$ 在细胞培养的第0天加入, $Ce^{3+}$ 的终浓度分别达到:0.025、0.050、0.075、0.100、0.125和0.150 mM,细胞培养20 d后收获,测定细胞生物量,细胞内喜树碱含量,结果见图1。低浓度的 $CeCl_3$ 对细胞生长具有促进作用,高浓度的 $Ce^{3+}$ 明显抑制细胞生长。当 $Ce^{3+}$ 浓度为0.050 mM时,细胞干重达到最大33.03 g/L,而对照,即没有加入 $CeCl_3$ 的培养细胞干重为26.38 g/L。对喜树碱合成而言,随着 $Ce^{3+}$ 终浓度的增加,喜树碱含量急剧升高,当 $CeCl_3$ 达到0.125 mM时,细胞内喜树碱含量达到最大,为细胞干重的0.0311%,是对照(含量为0.00723%)的4.31倍。同时,加入稀土元素后,次生代谢物能分泌到细胞外(表1)。随着 $CeCl_3$ 浓度的增加,分泌到细胞外的目的产物也不断增加。综合考虑胞内和胞外的情况,在 $Ce^{3+}$ 浓度为0.1 mM的诱导刺激下,喜树碱总产量达到最大值8.72 mg/L,是未处理的4.56倍。

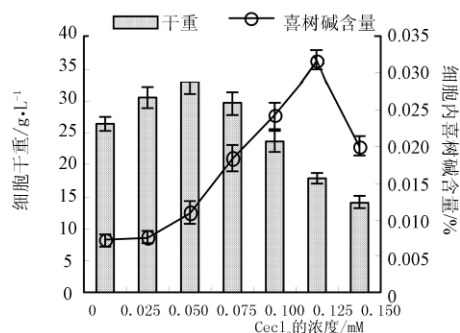


图1 不同浓度的 $Ce^{3+}$ 对喜树细胞生长和喜树碱含量的影响

表1 不同浓度的 $Ce^{3+}$ 对喜树碱产量和喜树碱渗透释放的影响

$Ce^{3+}$ 的浓度 / mM	胞内喜树碱产量 / mg · L <sup>-1</sup>	胞外喜树碱产量 / mg · L <sup>-1</sup>	喜树碱总产量 / mg · L <sup>-1</sup>
0.000	1.91±0.29	0	1.91±0.29
0.025	2.32±0.22	0.19±0.11	2.52±0.23
0.050	3.59±0.29	0.55±0.09	4.15±0.22
0.075	5.42±0.23	1.21±0.16	6.63±0.07
0.100	5.69±0.27	2.31±0.29	8.72±0.39
0.125	5.58±0.44	2.32±0.18	8.07±0.62
0.150	2.84±0.39	1.57±0.18	4.41±0.25

### 2.2 铈离子在不同培养时间加入对喜树碱产量的影响

从以上试验得到 $Ce^{3+}$ 在0.1 mM时,喜树碱的总产量达到最大值。分别在细胞生长的第0、5、10、15天加入0.1 mM的 $CeCl_3$ ,细胞培养20 d后收获,测定细胞生物量,细胞内喜树碱含量,结果见图2。从图2可知, $Ce^{3+}$ 在较早时期(即第0、5、10天)加入强烈抑制细胞生长,而在生长末期(第15天)对生长无明显影响。与此不同的是, $CeCl_3$ 在不同时间加入都能促进喜树碱的生物合成,但加入时间很重要。在第10天加入最有效,喜树碱的细胞内含量可达到0.03553%,是对照(含量为0.007667%)的4.37倍。不同时间加入的 $Ce^{3+}$ 刺激对喜树碱的渗透释放影响也不一样(表2),在第10天加入最有效,喜树碱的细胞外释放量可高达4.19 mg/L。总体而言, $CeCl_3$ 在第10天加入最有效,产量达到最大值13.02 mg/L,是对照的(2.04 mg/L)的6.39倍。

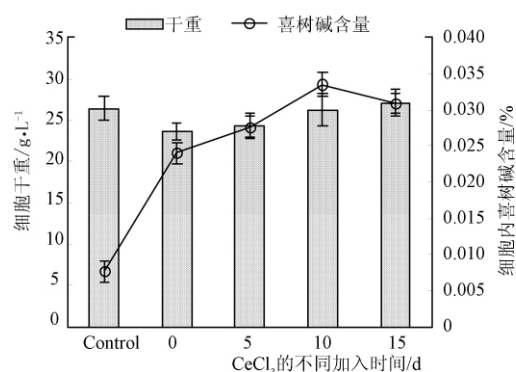


图2  $Ce^{3+}$ 的不同处理时间对喜树细胞生长和喜树碱含量的影响

表2  $Ce^{3+}$ 的不同处理时间对喜树碱产量和喜树碱渗透释放的影响

加入天数 / d	胞内喜树碱产量 / mg · L <sup>-1</sup>	胞外喜树碱产量 / mg · L <sup>-1</sup>	喜树碱总产量 / mg · L <sup>-1</sup>
Control	2.04±0.48	0	2.04±0.48
0	5.68±0.60	2.32±0.19	7.99±0.74
5	6.72±0.13	2.85±0.19	9.57±0.27
10	8.83±1.07	4.19±0.33	13.02±0.91
15	8.36±0.19	3.35±0.23	11.71±0.23

### 2.3 铈离子刺激对苯丙氨酸裂解酶活性和丙二醛含量的影响

0.1 mM  $Ce^{3+}$ 在第10天加入时可达到喜树碱的最大产量,为此,该试验从细胞培养的第10天加入0.1 mM  $Ce^{3+}$ ,从培养的第9天开始,每隔2 d取样,分别测定受 $Ce^{3+}$ 诱导处理的细胞和未受到处理的细胞苯丙氨酸裂解酶的活性和细胞内丙二醛的含量,其动态变化结果如图3所示。结果表明在 $Ce^{3+}$ 刺激的培养细胞,从第10天开始,PAL的活力和MDA的含量都显著增加。对PAL而言,经过处理的PAL活性在第15天达到最大值431 U/g FW,是对照的1.28倍(对照的在第17天达到最大值335 U/g FW)。经过处理和对照的细胞内MDA含量都在第19天达到最大值,受到诱导处理的细胞内MDA的含量为3.46  $\mu$ mol/g FW,是对照的1.58倍。

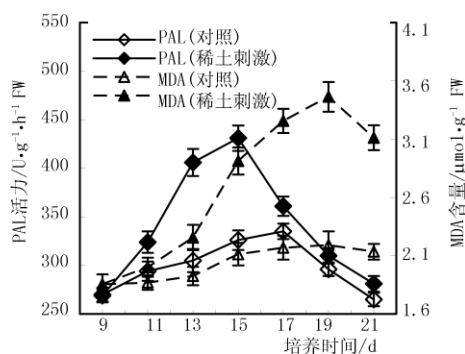


图3  $Ce^{3+}$  对苯丙氨酸裂解酶活性和丙二醛含量的影响

### 3 讨论

低剂量的  $CeCl_3$  对喜树细胞生长具有一定的促进作用(图1),同样的现象在肉苁蓉(*Cistanche deserticola*)和番红花(*Crocus sativus*)悬浮细胞培养中也得到证实<sup>[7-8]</sup>,这种在一定浓度范围内促进植物细胞生长的作用可能与植物激素的功能有某些相似性<sup>[6,10]</sup>。

较高剂量的  $CeCl_3$  非常显著地提高了喜树碱的生物合成(图2,表2),原因之一是稀土元素对次生代谢物的作用与它们的化学特性相关,稀土元素可以代替诸如  $Ca^{2+}$  或  $Fe^{3+}$  等金属离子,或者与这些金属离子竞争而结合在细胞膜的某些位点上,从而提高营养物质的吸收,同化,利用和转运,进而影响次生代谢或与次生代谢有关的生理生化变化<sup>[6,9-10]</sup>。从试验结果可知, $CeCl_3$  刺激处理过的悬浮培养细胞 PAL 的活性明显高于未经处理的培养细胞(图3)。PAL 是植物从初生代谢转变为次生代谢的关键酶之一<sup>[8,10]</sup>,铈离子刺激可以明显增加培养细胞 PAL 的活性从而启动喜树碱的合成。另一个原因是稀土元素与重金属离子相似的胁迫特性,导致细胞膜脂过氧化从而促进次生代谢产物向外释放,减少次生代谢产物在细胞内积累而引起的反馈抑制效应<sup>[7,12-13]</sup>。从图3可知,铈离子刺激明显的增加细胞内丙二醛(MDA)的含量,丙二醛是膜脂过氧化作用的最终分解产物,是常

用的膜脂过氧化指标<sup>[12]</sup>,从而导致喜树碱的胞外释放(表1-2)。

### 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] Lorence A, Nessler C L. Camptothecin, over four decades of surprising findings [J]. Phytochemistry, 2004, 65: 2735-2749.
- [4] 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 Regul, 2004, 44: 59-63.
- [5] 何跃君, 薛立. 稀土元素对植物的生物效应及其作用机理[J]. 应用生态学报, 2005, 16: 1983-1989.
- [6] 袁晓凡, 赵兵, 王玉春. 稀土元素在药用植物细胞和组织培养中的应用[J]. 植物学通报, 2005, 22: 115-120.
- [7] Ouyang J, Wang X D, Zhao B, et al. Effects of rare earth elements on the growth of *Cistanche deserticola* cells and the production of phenylethanoid glycosides [J]. Journal of Biotechnology, 2003, 102: 129-134.
- [8] Chen S, Zhao B, Wang X D, et al. Promotion of the growth of *Crocus sativus* cells and the production of crocin by rare earth elements [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26: 27-30.
- [9] Ge F, Wang X D, Zhao B, et al. Effects of rare earth elements on the growth of *Arnebia euchroma* cells and the biosynthesis of shikonin [J]. Plant Growth Regulation, 2006, 48: 283-290.
- [10] 罗建平, 曹磊, 潘利华, 等. 稀土元素对怀槐悬浮培养细胞异黄酮合成及氧化还原态的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14: 362-365.
- [11] Xu C M, Zhao B, Ou Y, et al. Elicitor-enhanced syringin production in suspension cultures of *Saussurea medusa* [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2007, 23: 965-970.
- [12] Wang Y L, Wang X D, Zhao B, et al. Enhancing antioxidative capacity of *Lepidium meyenii* calli by addition of methyl salicylate to culture medium [J]. Acta Physiol Plant, 2007, 29: 417-423.
- [13] Wu J Y, Wang C G, Mei X G. Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus* spp cell cultures by rare earth chemical lanthanum [J]. Journal of Biotechnology, 2001, 85: 67-73.

## Improvement of Camptothecin Production with Cell cultures of *Camptotheca acuminata* Decaisne by Rare Earth Element Cerium

PAN Xue-wu<sup>1,3</sup>, DONG Yan-ling<sup>2</sup>, SHI Ya-ya<sup>3</sup>, XU Heng-hao<sup>3</sup>

(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:** In suspension cultures of *Camptotheca acuminata* Decaisne, one kind of rare earth elements, cerium (as  $Ce^{3+}$ ) could significantly elicit and improve the biosynthesis of camptothecin. When the concentration of cerium at 0.1 mM was supplemented on the 10th day, maximum camptothecin production was achieved, reaching 13.02 mg/L, which was 6.39-folds of that of the control. Accordingly, higher phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity and malondialdehyde (MDA) contents of the treated cultures increased as well.

**Key words:** rare earth element; *Camptotheca acuminata* Decaisne; cerium; plant cell culture