

## 几种红豆杉植物及其愈伤组织的同工酶比较研究

中国医学科学院 药物研究所(北京 100050) 赵 剑\* 朱蔚华  
协和医科大学

**摘 要** 对东北红豆杉、云南红豆杉、中国红豆杉和南方红豆杉的幼茎、针叶及其茎来源的愈伤组织的过氧化物酶(POD)、酯酶(EST)、多酚氧化酶(PPO)及超氧化物歧化酶(SOD)的同工酶,可溶性蛋白的含量及电泳谱带,多酚氧化酶和苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性作了比较研究。并探索了这几种同工酶的酶谱和两种酶活性与紫杉醇的生物合成的关系。

**关键词** 红豆杉植物 愈伤组织 同工酶 紫杉醇 生物合成

紫杉醇是一种有很强的广谱抗肿瘤活性的二萜化合物,目前主要用于治疗卵巢癌和乳腺癌。并可望用于其它癌症的治疗,紫杉醇抗肿瘤机理独特,它可诱导和稳定微管聚合,阻止其解体,使癌细胞停止于 G<sub>2</sub>/M 期直至死亡,是一种非常具有前途的抗肿瘤新药<sup>[1]</sup>。紫杉醇目前主要从红豆杉植物中提取,因含量低,红豆杉植物资源有限,使市场供应出现危机<sup>[2]</sup>。人们希望用大规模红豆杉组织培养的方法来解决。但红豆杉组织培养有很多问题。其中愈伤组织生产紫杉醇很不稳定的问题难以解决,所以通过诱变筛选高产稳定且耐高浓度紫杉醇的细胞系是重要的解决办法之一,这需经常用 HPLC 或 ELISA 检测愈伤组织中紫杉醇的存在和含量,费时且昂贵。考虑到细胞变异和同工酶及紫杉醇类化合物生物合成和体内各种氧化酶如多酚氧化酶,酯酶及一些简单的次生代谢物合成酶如苯丙氨酸解氨酶等可能有很大关系,我们便期望通过对植物体及其愈伤组织的各类细胞系的内同工酶酶谱和重要酶的活性的比较研究来找出它们的谱带和活性与紫杉醇合成的关系,为简化稳定高产细胞系的筛选程序,探索紫杉

醇生物合成途径及催化酶系奠定基础。本研究在国内外尚未见报道。

### 1 材料与方法

1.1 试材与处理:云南红豆杉 *Taxus yunnanensis* (简称 Tyu),东北红豆杉 *T. cuspidata* (简称 Tcu),南方红豆杉 *T. chinensis* var. *mairei* (简称 Tcm)均为我室盆栽的 5 年龄树,9 月份采 2 年生幼茎和针叶作为材料。中国红豆杉 *T. chinensis* (简称 Tch)和以上 3 种红豆杉的茎来源的愈伤组织均为我室培养继代多次的细胞系<sup>[3]</sup>。取生长对数期的各细胞系作为材料。取材料清洗干净, -20 ℃ 冷冻 2 h,取出置于研钵加提取缓冲液和少量石英砂 4 ℃ 下冰浴研磨。提取缓冲液组成:0.05 mol/L PBS (pH 6.8) 含 0.006 mol/L 抗坏血酸,1%PVP,0.005 mol/L EDTA,5%甘油。研磨液经纱布过滤,在冷冻离心机中 4 ℃ 下 13 000 r/min 离心 20 min,取上清液做同工酶和酶活性分析。

1.2 同工酶电泳:采用垂直板不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳。POD 和 PPO 同工酶均采用 8%分离胶,4%浓缩胶;EST 和可溶性蛋白采用 7.5%分离胶,3.75%浓缩胶;SOD 采用

\* Address: Zhao Jian, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Chinese Xiehe Medical University, Beijing

赵 剑 男,1992 年毕业于内蒙古师范大学生物系,1995 年于东北师范大学生命科学学院获植物学硕士学位,现在中国医学科学院药物研究所读博士学位,从事药用植物长春花、红豆杉的组织细胞培养及次生代谢研究。曾在《生物物理学报》、《西北植物学报》、《应用与环境生物学报》、《植物生理学通讯》等刊物发表学术论文数篇。

10%分离胶,4%浓缩胶;分离胶用过硫酸铵化学聚合,浓缩胶用核黄素光聚合。加相同量样品后,先在180 V恒压下电泳,当溴酚蓝进入分离胶后,在250 V恒压下电泳4 h~5 h,直至完成(均在4℃下进行)。POD和EST酶带显色按吴少伯的方法<sup>[4]</sup>,SOD按王爱国的方法<sup>[5]</sup>,PPO按梁厚果的方法<sup>[6]</sup>染色,可溶性蛋白用考马斯亮蓝染色。染色后拍照或制成干胶保存。

1.3 酶活性测定:苯丙氨酸解氨酶活性按薛应龙的方法测定<sup>[7]</sup>;多酶氧化酶活性按Anosike的方法测定<sup>[8]</sup>;可溶性蛋白含量按Bradford的方法测定<sup>[9]</sup>;以牛血清蛋白为标准。

2 结果与分析

2.1 POD同工酶:POD广泛参与生物体内的物质代谢,包括木质素,细胞壁的形成及植物次生代谢。由图1可见,POD同工酶谱带在植物体的幼茎和针叶及茎的愈伤组织中差别较大,它们的酶谱均可分为A,B,C3区,A区的 $R_f=0.03$ ,B区的 $R_f=0.14,0.17,0.20,0.21$ ,C区的 $R_f=4.3$ 为幼茎,针叶,愈伤组织共有的酶带。其中 $R_f=0.03,0.21$ 带在幼茎和针叶中较强,而在愈伤组织中较弱,B区的其余3条带在愈伤组织中表达丰富,而在茎叶中较少。Tch的愈伤组织和Tcu的幼茎和针叶中在 $R_f=0.12$ 处有特异带;几种愈伤组织中的C区除Tch有一条 $R_f=4.3$ ,4.0的强带和弱带外,Tcu,Tyu,Tcm均另有 $R_f=4.1,4.3$ 带。而Tcm,Tcu,Tyu的幼茎和针叶均有两条 $R_f=4.1,4.3$ 的强带,另外Tcu尚有 $R_f=4.0,4.4$ 两条带,而Tcm有 $R_f=4.4$ 的弱带。总的看,几种愈伤组织中B区酶带活性比茎叶中强(除 $R_f=0.21$ )。

2.2 PPO同工酶:PPO可氧化多种多酚类底物的羟基生成羰基,可能在紫杉醇类化合物的生物合成中起一些作用。由图2可见,PPO同工酶谱可分为A,B,C,D4区,A区 $R_f=0.03,0.06,0.09$ ,B区的 $R_f=0.14,0.17,0.2,0.25$ ,C区的 $R_f=0.4,0.42$ 酶带

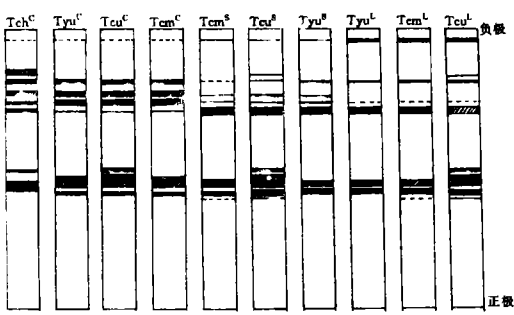


图1 过氧化物同工酶

Tch<sup>c</sup>、Tyu<sup>c</sup>、Tcu<sup>c</sup>、Tcm<sup>c</sup>-分别指 Tch、Tyu、Tcu、Tcm 的幼茎来源的愈伤组织 Tcm<sup>s</sup>、Tcu<sup>s</sup>、Tyu<sup>s</sup>-分别指 Tcm、Tcu、Tyu 植物的幼茎 Tyu<sup>l</sup>、Tcm<sup>l</sup>、Tcu<sup>l</sup>-分别指 Tyu、Tcm、Tcu 植物的针叶(下图均同)

均为几种红豆杉的幼茎,针叶和愈伤组织所共有。其中Tch的愈伤组织中有与Tcu的茎叶相同的 $R_f=0.12$ 的特异酶带,而Tch,Tcu,Tcm,Tyu4种愈伤组织特有D区 $R_f=0.54,0.56,0.57,0.58$ 的弱酶带。且愈伤组织和叶中均有 $R_f=0.13$ 的共同酶带。与POD酶谱相似,3种红豆杉植物体均有相对较强的 $R_f=0.2$ 酶带。C区的酶带中Tcu与其它几种有较大差别(特有 $R_f=0.43,0.44$ 带),只与Tcm相似(都有 $R_f=0.38$ 的带)。总体看,PPO与POD的同工酶谱有很大程度的相似。这可能因为他们有相似或相同的底物及催化特性。总的来看,愈伤组织的B区酶带比较强,并且有D区特异表达的酶带。而且茎叶组织中POD的C区酶带活性较强。

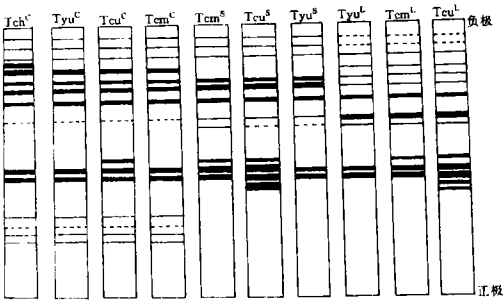


图2 多酚氧化酶同工酶

2.3 SOD同工酶:SOD主要与超氧化物阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)的清除有关,是维持生物体内

自由基代谢平衡的主要酶之一。而氧自由基如  $O_2^-$ ,  $\cdot OH$ ,  $H_2O_2$  等在次生代谢中也起一定作用<sup>[10]</sup>。由图 3 可见,几种红豆杉植物幼茎,针叶及愈伤组织中有 3 条共同的酶带:  $Rf=0.37, 0.40, 0.43$ , Tcu, Tcm, Tyu 3 种植物体的茎叶区别于所有 4 种愈伤组织的特异酶带是  $Rf=0.53$ , 而 3 种植物的针叶特异酶带在  $Rf=0.84$  处。种间比较, Tyu 的茎叶中有  $Rf=0.35$  的特异酶带。活性比较可见, 针叶、幼茎和愈伤组织的 SOD 活性依次减弱。Tcu 的活性最强; Tch 的活性最弱。所以 SOD 的多态性不强。总的看, 茎叶组织中 SOD 活性较强, 并有正极区的特异酶带。

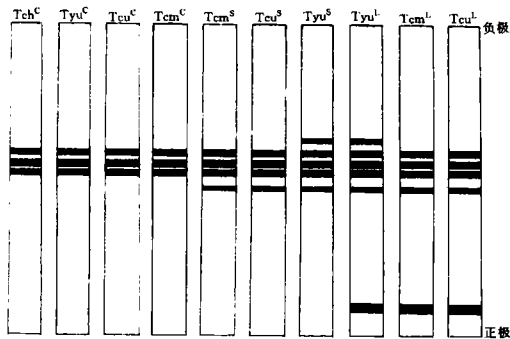


图 3 超氧化物歧化酶同工酶

2.4 EST 同工酶: EST 是多种碳酸酯的水解酶, 底物特异性不强, 所以可能参与紫杉烷类化合物的生物合成和转化。由图 4 可见, 红豆杉植物及其愈伤组织的 EST 多态性很强。其同工酶谱带可分为 A, B, C 3 区, 其中 A 区的  $Rf=0.24, 0.26, 0.28, 0.30$ , B 区的  $Rf=0.39, 0.43, 0.46, 0.49, 0.51, 0.53$ , C 区的  $Rf=0.74, 0.76, 0.78$  谱带为 Tcu, Tcm, Tch 和 Tyu 所共有。  $Rf=0.70$  为针叶特有;  $Rf=0.35$  为 Tcm 特有;  $Rf=0.62, 0.64, 0.68$  酶谱为愈伤组织和幼茎共有, 但愈伤组织中表达最丰富; C 区  $Rf=0.87$  为 Tch, Tyu 愈伤组织所共有;  $Rf=0.64, 0.74, 0.78$  3 条在愈伤组织中极强的带在茎叶却很弱 (除 Tcu 外);  $Rf=0.80, 0.81$  似乎为 Tcu 所有的弱带。总的看, 愈伤组织和茎叶中的 EST 酶谱差别较大。愈伤组织中间靠近正极处的酶带

相对较强, 而茎叶组织中酶活性则主要集中在中间靠近负极区。Tcu 的茎叶介于上述两种状况之间。

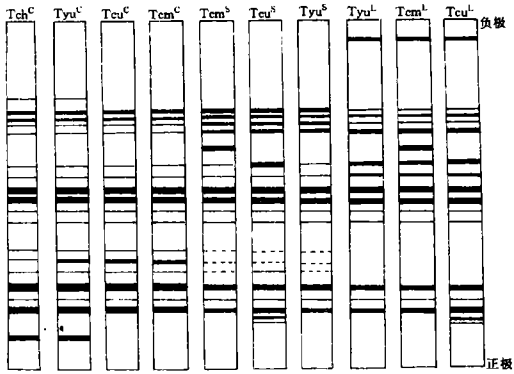


图 4 酯酶同工酶

2.5 可溶性蛋白图谱: 由图 5 可见, 可溶性蛋白图谱中除了上述几种酶谱外, 尚有一些组织特异性谱带。如  $Rf=0.85$  为愈伤组织中特有,  $Rf=0.60, 0.79$  为茎叶组织中所特有; 但可溶性蛋白的图谱较复杂。

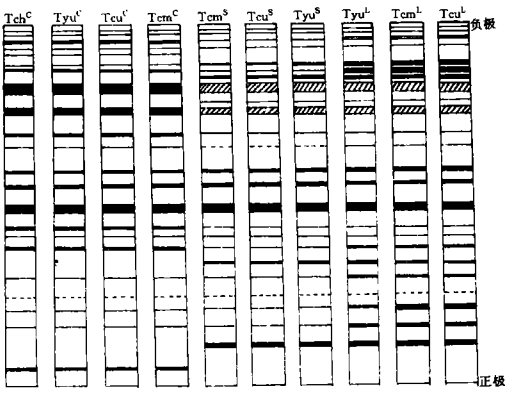


图 5 可溶性蛋白图谱

2.6 几种酶活性比较: PAL 在紫杉醇的 C-13 侧链的生物合成中很可能起重要作用。由表 1 可见, PAL 酶活性在针叶中最高, 幼茎其次, 愈伤组织中最低。而且在这 3 种组织中, Tcu 的 PAL 酶活性最高, Tyu, Tcm 和 Tch 的 PAL 酶活性依次减弱。PPO 的活性在愈伤组织中最高, 针叶中其次, 幼茎中最低。Tyu 和 Tcu 分别在针叶中和幼茎中最高, 但在愈伤组织中均低于 Tcm 和 Tch。可溶性蛋白含量也可反映组织细胞中酶的丰

度,但不一定是次生代谢的酶,愈伤组织和幼茎中可溶性蛋白含量低而针叶中较高,但幼

茎和针叶中紫杉醇含量较高,可愈伤组织中几乎检测不到。

表 1 几种红豆杉茎和叶及其来源的愈伤组织的苯丙氨酸解氨酶、多酚氧化酶的活性和可溶性蛋白含量

| 材 料     | 茎         |           |           | 叶         |           |           | 愈伤组织      |           |           | 中国<br>Tch |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|         | 东北<br>Tcu | 云南<br>Tyu | 南方<br>Tcm | 东北<br>Tcu | 云南<br>Tyu | 南方<br>Tcm | 东北<br>Tcu | 云南<br>Tyu | 南方<br>Tcm |           |
| 苯丙氨酸解氨酶 | 109.1     | 93.2      | 100.5     | 259.3     | 144.2     | 149.5     | 85.9      | 60.5      | 67.8      | 58.7      |
| 多酚氧化酶   | 6.62      | 2.52      | 1.83      | 7.28      | 15.61     | 4.03      | 16.07     | 10.78     | 19.9      | 27.80     |
| 可溶性蛋白   | 9.75      | 7.28      | 8.40      | 15.41     | 11.62     | 10.56     | 4.55      | 3.85      | 3.93      | 2.91      |

3 讨论

在各种红豆杉植物及其各部位的紫杉醇等紫杉烷化合物的生物合成和含量测定的研究中,人们发现韧皮部及其靠近微管形成层有最大的紫杉醇合成能力<sup>[11]</sup>。紫杉二烯合成酶的定位也证明红豆杉幼茎因高组成的韧皮部而有很高活性<sup>[12]</sup>。紫杉醇可能在韧皮薄壁细胞的质体,微粒体等细胞器和胞浆中分步合成后储存于液泡<sup>[13]</sup>。另外发现幼茎中无论紫杉醇或三尖杉宁碱还是他们的前体化合物巴卡亭,10-脱乙酰巴卡亭,10-脱乙酰紫杉醇等含量似乎一样多,并且均高于针叶,而针叶中紫杉醇和三尖杉宁碱含量低于巴卡亭等前体物质,即针叶中似乎合成紫杉醇过程的后几步的酶较少。而我们筛选的几种红豆杉愈伤组织产生紫杉醇较少而只合成另一类紫杉烷类化合物<sup>[14]</sup>。而且在云南红豆杉,东北红豆杉,中国红豆杉,南方红豆杉等几种基因型中,中国红豆杉和云南红豆杉中紫杉醇含量最高,东北红豆杉和南方红豆杉中较少。当然这只是相对而言,因为季节等环境因子也影响着紫杉醇的合成代谢。这为我们寻找同工酶和紫杉醇合成的关系提供了依据。

在同工酶和次生代谢的关系方面,黄秀兰等曾研究并论证了唇形科 18 种植物的二萜醌类化合物和过氧化物酶同工酶的一致性关系<sup>[15]</sup>。近年来,细胞色素 P450 就被证明广泛参与植物的次生代谢<sup>[16]</sup>。紫杉醇类化合物的次生代谢过程除了与其生源相关的几种合成途径如甲羟戊酸途径,莽草酸途径等的催化酶类密切相关外,还与某些底物特异性不强的氧化酶,磷酸酯酶,酯酶有相关,同样与

氧自由基的参与有关。从这些酶的催化特性和紫杉醇类化合物的结构及生源看,POD 和 EST 可能与紫杉醇的生物降解和转化有关,PPO 和 SOD 可能在紫杉醇合成代谢间接地起作用,也对我们控制愈伤组织的褐化,提高其生长速率及作为细胞系的筛选标志有益。

比较可见,几种红豆杉茎和针叶中均有特异的 EST,PPO,POD 和 SOD 酶带存在,愈伤组织也有特异酶带。这些不同可能是造成紫杉烷类化合物在幼茎,针叶,愈伤组织的合成和积累的差异,尤其它们的共有酶带的强弱差别和特异酶带的存在无疑是使次生代谢发生变化的生理环境因素。如愈伤组织的酶带和活性分布显示了与茎叶组织较大的差别,这是否与愈伤组织中合成紫杉醇较少而茎叶组织中合成紫杉醇较多的差异有直接关系呢?而且紫杉醇合成较弱的 Tcu 茎叶组织的同工酶的活性分布往往介于愈伤组织和茎叶之间。这都需进一步比较研究来确证。但这些酶带和活性的差别也为细胞系的筛选和鉴定提供了可靠依据。PAL 活性似乎与紫杉醇的合成无直接关系,因为紫杉醇含量高的红豆杉(如 Tyu 和 Tcm)的 PAL 活性比紫杉醇含量低的红豆杉(如 Tcu)的 PAL 活性低,这与 Platt 和 Fleming 等人<sup>[17,18]</sup>的研究结果一致。PPO 活性变化较复杂,似乎与紫杉醇的含量无直接关系。本文还为进一步研究紫杉醇类化合物的生物合成的酶学作了基础工作。

参 考 文 献

1 Schiff PB,et al. Nature,1979;277(22):665

- 2 刘本叶,等. 植物学通报,1995;12(3):8
- 3 朱蔚华,等. 中药材,1991;14(9):5
- 4 吴少伯. 植物生理学通讯,1979;1:30
- 5 罗广华,等. 植物生理学通讯,1983;6:44
- 6 毕玉蓉,等. 实验生物学报,1988;21(3):257
- 7 薛应龙,等. 植物生理学报,1983;9(3):301
- 8 Anosike E O. J. Exp Bot,1982;33:487
- 9 Bradford MM. Anal Biochem,1976;72:248
- 10 Elstner EF. Ann Rev Plant Physiol,1982;33:73
- 11 Strobel GA,et al. Plant Sci,1993;92:1
- 12 Hezari M, et al. Archives Biochemistry and Biophysics,1995;322(2):437
- 13 Smith RJ. PCT,WO,9321025,1993:5
- 14 Chen KD,et al. PCT/JP Appl,1992,92:249,047
- 15 黄秀兰,等. 植物学报,1983;25(2):145
- 16 Bolwell GP,et al. Phytochemistry,1994;37(6):1491
- 17 Platt RV,et al. Phytochemistry,1984;23(10):2211
- 18 Fleming PE,et al. J Am Chem Soc.1993;115:805

(1997-05-07 收稿)

## Comparative Study on Isoenzymes and Activities in Several Taxus Species and Their Calli Related to Taxol Biosynthesis

Zhao Jiam,Zhu Weihua (Institute of Materia Medica,Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College,Beijing 100050)

**Abstract** The isoenzymes of peroxidase (POD), polyphenoloxidase (PPO), esterase (EST), and superoxide dismutase (SOD) in twigs, needles and calli of several *Taxus* species were studied using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The different enzymographic patterns of these isoenzymes on taxol biosynthesis were compared, and the activities of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and polyphenoloxidase tested to explore the relationships between taxol biosynthesis and these enzymes.

**Key Words** *Taxus* species callus isoenzymes taxol biosynthesis

## 现今进口降香并非印度黄檀心材

广州市药品检验所(510160)    李书渊\*  
广州中医药大学                      刘心纯

**摘 要** 通过对印度黄檀心材与进口降香商品药材在性状、显微、理化等几个方面的比较鉴别,认为现今进口降香非印度黄檀心材,否定了以往文献的观点。

**关键词** 进口降香 印度黄檀 鉴定

据已往文献报道<sup>[1~5]</sup>,进口降香的来源是豆科黄檀属印度黄檀 *Dalbergia sissoo* Roxb., 通过从性状、显微、理化等几个方面的比较鉴别研究,否定了这一结论。实验表明,进口降香并非来源于印度黄檀,而可能是来源于豆科黄檀属它种植物。

### 1 实验材料

样 1:印度黄檀心材,采自广州广东省林科所引种的豆科植物印度黄檀 *Dalbergia sissoo* Roxb. 树干的心材(由广州中医学院徐鸿华副教授鉴定)。

样 2:印度黄檀心材,采自广州华南植物园引种的豆科植物印度黄檀 *D. sissoo* Roxb. 树干的心材(由广州市药检所仇良栋

\* Address: Li Shuyuan, Guangzhou Municipal Institute for Drug Control, Guangzhou

李书渊 1985年毕业于广东药学院。1992年获得主管药师职称。1995年毕业于广州中医药大学,获硕士学位。现从事中药检验工作。