

· 药剂与工艺 ·

花生四烯酸在紫杉醇生物合成途径上作用位点的研究[△]

天津大学生物化学工程系 (300072) 苗志奇* 未作君 元英进**

摘 要 利用短期诱导实验,分析了花生四烯酸对红豆杉细胞培养中紫杉烷合成的影响。在适宜浓度的花生四烯酸诱导下,紫杉醇(taxol)的产量提高了近 3 倍,同时 10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ(10-DAB)与巴卡亭Ⅲ(baccatinⅢ)相应上升。通过对紫杉醇合成代谢途径的等拓扑结构简化与动力学分析,获得了诱导子加入后可能的 3 种中间代谢产物浓度转移模式。结合花生四烯酸短期诱导实验结果,提出了花生四烯酸的加入提高了 10-DAB 合成通量的观点,诱导子作用位点的确定为多诱导子配伍方案奠定了基础。

关键词 紫杉醇 花生四烯酸 作用位点 植物细胞培养

Studies on the Acting Point of Arachidonic Acid in Taxol Biosynthetic Pathway

Department of Biochemical Engineering, Tianjin University (Tianjin 300072) Miao Zhiqi, Wei Zuojun and Yuan Yingjin

Abstract The influence of arachidonic acid on the production of taxanes in the process of plant cell culture was studied by short term elicitation experiments. Experiments showed that arachidonic acid at a concentration of 0.1 mg/L can improve the production of taxol nearly three-fold. It was discovered that the concentration of 10-deacetyl baccatin III (10-DAB III) and baccatin III were also increased while taxol concentration increases under arachidonic acid elicitation. By dynamic kinetic analysis on the simplified taxol biosynthetic pathway, the mode of taxoid concentration transformation may proceed in three different ways. On the basis of experimental results of arachidonic acid elicitation, it could be postulated that at certain concentration of arachidonic acid the reaction rate for the production of 10-DAB III could be increased. To define such a point precisely may provide a basis to achieve a synergistic action of multiple-elicitors.

Key words taxol arachidonic acid the acting point of enzyme plant cell culture

脂肪酸,特别是多羟基不饱和脂肪酸,被认为可以激活防御诱导和防御相关基因,是植物病理反应和信号传导系统的一组重要物质。抗癌药物紫杉醇是红豆杉属植物在病理条件下合成的一种二萜类物质,可以杀伤寄生真菌,抵御真菌入侵,属于植物病理反应产物,文献报道经过诱导^[1-9]的红豆杉细胞中紫杉醇含量出现上升。

本文尝试将一种重要的脂肪酸——花生四烯酸应用于南方红豆杉细胞培养体系,研究花生四烯酸的加入与紫杉烷产量间的对应关系,寻找最优的花生四烯酸诱导浓度,并结合紫杉醇生物合成途径的研究成果,利用动力学定性分析,在酶水平以及次生代谢水平上,研究花生四烯酸加入后紫杉醇合成途径中酶活力与代谢通量改变,确定花生四烯酸在紫杉醇生物合成途径上的作用位点与配伍特性,为实现多种诱导子协同配伍方案奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株系:实验中所采用的细胞为南方红豆杉细胞的一个变种 YH

1.2 培养基:培养基采用含蔗糖 20 g/L 的 B5 培养基 培养基 pH 值在灭菌前调整到 5.8

1.3 诱导子实验设计:采用 250 mL 的锥形瓶摇床培养,转速定为 100 r/min 每瓶盛 40 mL 实验用培养基,接入 3 g(以湿重计)混合均匀的种子细胞 为保证实验结果的有效性,每个实验都采用 3 个平行组,培养第 6、10 天后分别取样,检测细胞的生长量与紫杉烷含量 实验用培养基为含不同浓度花生四烯酸的 B5 培养基,其中花生四烯酸浓度如表 1 所示

1.4 细胞干湿重测量:培养物在 3 000 r/min 离心 30 min,收集细胞,测量湿重 将细胞在 60℃ 下烘干至恒重,测量细胞干重

* Address: Miao Zhiqi, Department of Biochemical Engineering, Tianjin University, Tianjin

** 通讯联系人

△教育部“跨世纪优秀人才培养计划”基金和天津市委项目(963107211)资助

表 1 花生四烯酸短期诱导实验设计

实验编号	花生四烯酸浓度 mg/L
A	0
B	0.1
C	1
D	10

1.5 紫杉烷的提取与测量方法:按文献^[6]方法,结果如下。

2 结果分析

图 1,2分别是第 6,10天时紫杉醇合成途径中关键性中间代谢产物的浓度,其中实验编号对应花生四烯酸浓度如表 1所示

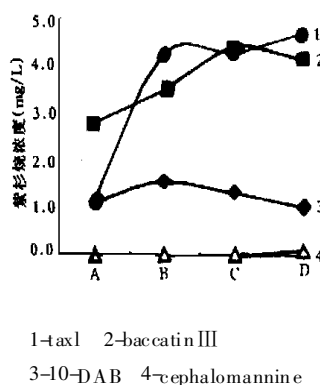
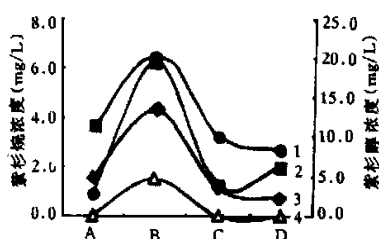


图 1 不同浓度花生四烯酸诱导下第 6 天后紫杉烷含量的变化



(1-4同图 1)

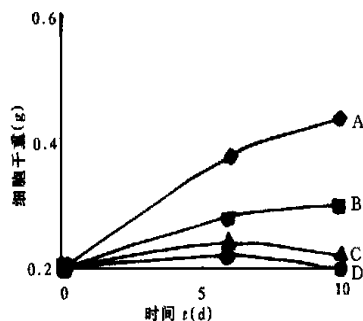
图 2 不同浓度花生四烯酸诱导下第 10 天后紫杉烷含量的变化

从图 1可以看出加入花生四烯酸 6 d后,紫杉醇的含量与花生四烯酸的加入浓度呈现为一条饱和曲线。当花生四烯酸加入浓度小于 0.1 mg/L时,紫杉醇的含量随花生四烯酸的增加而增加;当花生四烯酸浓度大于等于 0.1 mg/L时,紫杉醇的含量保持恒定,与花生四烯酸的浓度无关。同时 10-DAB和 baccatin III的含量出现上升。

从图 2可以看出花生四烯酸加入第 10天后,其对紫杉醇含量的影响体现得更明显。当花生四烯酸浓度小于 0.1 mg/L时,紫杉醇的含量随花生四烯酸的增加而增加;当花生四烯酸浓度等于 0.1 mg/L时,紫杉醇的含量最高,比对照组高出近 3倍;当花

生四烯酸的浓度大于 0.1 mg/L,随着花生四烯酸浓度的提高,紫杉醇含量出现下降。

对照细胞的生长曲线(图 3),可以看出 1和 10 mg/L的花生四烯酸明显抑制细胞生长,细胞在第 6 天取样时就已经出现大量死亡。因为紫杉醇的产量等于单位质量的细胞中紫杉醇的产量与细胞量的乘积,所以高浓度的花生四烯酸并不能提高紫杉醇的产量。而 0.1 mg/L的花生四烯酸既能通过诱导作用提高紫杉醇的合成速率,又保持了一定的细胞活力,达到了紫杉醇合成速度与细胞活力的最佳平衡,因此在第 10 天时获得了最大的紫杉醇产量。



(A B C D 见表 1)

图 3 花生四烯酸诱导下细胞生长曲线

综合以上分析,适宜浓度花生四烯酸作为一种诱导子,在加入细胞培养体系 10 d后,可以提高紫杉醇的产量到对照组的 4 倍。另外在花生四烯酸诱导下 10-DAB, baccatin III的含量与紫杉醇的含量呈现出明显的正相关性。0.1 mg/L的花生四烯酸造成 10-DAB, baccatin III与紫杉醇含量的同时上升。这种正相关性包含了花生四烯酸对紫杉醇生物合成途径中酶活力和代谢通量的信息。

3 花生四烯酸对紫杉醇合成动力学的影响

3.1 紫杉醇生物合成途径的拓扑简化:紫杉醇生物合成途径非常复杂,涉及酶、代谢产物众多,因此必须在保持拓扑结构不变的前提下,对该途径进行简化,才能适合动力学分析的需要。具体方法是:三尖杉磷碱(cephalomannine)的含量无论在实验组还是在对照组都非常低,因此该支路在简化中被忽略;利用三个关键中间代谢产物:10-DAB, baccatin III和 taxol,将紫杉醇生物合成与降解途径划分为顺序串联的四段,在每段中都用一个虚拟酶来等效代替生物合成途径中实现相同催化功能的一系列酶,从而简化代谢途径(见图 4)。

诱导子在紫杉醇生物合成与降解途径上的作用位点是指诱导子加入反应速度得到最大程度提高的

那步生化反应。在模型分析中诱导子的作用位点的详尽程度必然受途径拓扑简化程度的影响,由于在本模型中紫杉醇生物合成途径被分为三段,因此利用模型确定的作用位点有三种可能,分别在 10-DAB之前、10-DAB和 baccatin III之间、和 baccatin III与 taxol之间。

3.2 紫杉醇生物合成动力学分析: 根据紫杉醇的生物合成途径(图 4),以酶促反应动力学中最常用的 Monod方程为基础,可以得出模型



图 4 紫杉醇生物合成途径简图

表示物质 M 的合成反应的反应速率, R_M 表示物质 M 合成反应的最大反应速率, $K_{M,S}$ 表示物质 M 的底物饱和系数, $K_{M,I}$ 表示物质 M 的产物抑制系数, D B T 分别表示培养体系中 10-DAB, baccatin III, taxol 的含量

10-DAB 的生成反应速率为:

$$r_D = R_D \frac{1}{1 + K_{D,I} D}$$

baccatin III 生成速率为:

$$r_B = R_B \frac{D}{K_{D,S} + D} \frac{1}{1 + K_{B,I} B}$$

紫杉醇生成速率为:

$$r_T = R_T \frac{B}{K_{B,S} + B} \frac{1}{1 + K_{T,I} T}$$

假设紫杉醇的降解产物为 X, 紫杉醇的降解速率为:

$$r_X = R_X \frac{T}{K_{T,S} + T}$$

10-DAB baccatin III 和 taxol 的浓度可以用下

表 2 诱导子的作用位点与其诱导下紫杉烷含量转换模式间的关系

模型参数	紫杉烷含量转移模式 1	紫杉烷含量转移模式 2	紫杉烷含量转移模式 3
R_D	↑		
R_B		↑	
R_T			↑
D	↑	↓	↓
B	↑	↑	↑
T	↑	↑	↑
途径代谢通量	↑	↑	↑
诱导子作用位点	10-DAB之前	10-DAB与 baccatin III之间	baccatin III与 taxol之间

10-DAB, baccatin III 的浓度比对照组出现上升。对照上表, 花生四烯酸的作用位点在 10-DAB, 即花生四烯酸通过提高催化 10-DAB 合成酶的酶活力, 从而提高紫杉醇的产量。而任何假定花生四烯酸作用在 10-DAB 之后都会与实践中的 baccatin III 含量上升

式表示:

$$D = D^0 + \int_0^t (r_D - r_B) dt$$

$$B = B^0 + \int_0^t (r_B - r_T) dt$$

$$T = T^0 + \int_0^t (r_T - r_X) dt$$

对照以上三种可能的作用位点, 若花生烯酸作用在 10-DAB 之前, 则 10-DAB 的合成速度比对照组得以提高, 因此其浓度就会上升; 10-DAB 是 baccatin III 合成的底物, 因此 10-DAB 浓度的上升通过底物效应增加了 baccatin III 合成速度, baccatin III 含量相应上升; 同理, baccatin III 浓度的上升通过底物效应导致了紫杉醇含量的上升。

若花生四烯酸作用在 10-DAB 与 baccatin III 之间, 则从 10-DAB 到 baccatin III 间的反应速度比对照组得以提高, 因此底物 10-DAB 浓度出现下降, 产物 baccatin III 浓度就会上升; baccatin III 是紫杉醇合成的底物, 因此 10-DAB 浓度的上升通过底物效应增加了紫杉醇的合成速度, 紫杉醇含量相应上升。

若花生四烯酸作用在 baccatin III 与紫杉醇之间, 则从 baccatin III 与紫杉醇间的反应速度比对照组得以提高, 因此底物 baccatin III 浓度出现下降, 产物紫杉醇浓度就会上升; baccatin III 是 10-DAB 消耗反应的产物, 因此 baccatin III 浓度的下降必然部分消除产物抑制, 10-DAB 消耗反应的反应速率上升, 10-DAB 浓度相应下降。

综合以上分析, 可以看出不同作用位点的诱导子在短期诱导实验中会导致的 10-DAB baccatin III 紫杉醇浓度的不同变化模式, 如表 2 所示。

适宜浓度的花生四烯酸在实验中提高了紫杉醇的产量, 即提高了紫杉醇合成途径的代谢通量, 同时

的实验现象矛盾。

4 结论

花生四烯酸的加入可以提高红豆杉培养体系中紫杉醇生物合成途径的代谢通量, 0.1 mg/L 的花生四烯酸诱导下紫杉醇含量提高到对照组的四倍。同

时 10-DAB, baccatin III 的含量也相应上升。通过动力学分析,确定花生四烯酸在紫杉醇生物合成途径上的作用位点在 10-DAB 之前

如果在细胞培养的对数期后期加入三种作用位点不同的诱导子,分别提高紫杉醇合成途径上三个阶段的反应速度,从而解除紫杉醇合成途径的多重限速步骤,提高紫杉醇合成代谢途径的代谢通量,结合释放与反应分离偶合技术,就可以大幅度提高紫杉醇产量

参 考 文 献

- 1 Choi H K, *et al.* WO 96/3410
- 2 Giddi V, *et al.* Biotechnology Letters, 1995, 17(12): 1343
- 3 Fett-Neto G, *et al.* Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44 205
- 4 Hirasuna J, *et al.* Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1996, 44 95
- 5 元英进,等. 中国稀土学报, 1998, 16 56
- 6 Moon W J, *et al.* Biotechnology Techniques, 1998, 12(1): 79
- 7 Choi D, *et al.* Proc Natl Acad Sci U SA, 1994, 91 2329
- 8 Mirjalili N, *et al.* Biotechnol Prog, 1996, 12 110
- 9 Ketchum R E B, *et al.* Biotechnology and Bioengineering, 1999, 62(1): 97

(1999-09-08收稿)

青蒿素提取条件研究[△]

中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室 (北京 100080)

赵 兵* 王玉春 吴 江** 闭静秀 欧阳藩

摘 要 以干青蒿叶末为原料,分别用乙醚、氯仿、正己烷、石油醚 (30℃ ~ 60℃) 搅拌提取青蒿素,结果表明石油醚是较适宜的提取介质。对石油醚提取青蒿素的工艺条件,如温度、时间、溶剂量及搅拌速度等进行了较系统研究,确定了较佳的工艺操作条件。

关键词 青蒿素 青蒿 提取工艺

Studies on the Extraction Processes of Artemisinin

State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, Chinese Academy of Sciences (Beijing 100080) Zhao Bing, Wang Yuchun, Wu Jiang, Bi Jingxiu and Ouyang Fan

Abstract Powdered dry leaves of *Artemisia annua* L. were extracted with ether, chloroform, n-hexane and petroleum ether (30℃ ~ 60℃) under stirring. Results showed that petroleum ether was the best solvent of choice. The major conditions for the extraction, such as temperature, duration of extraction, amount of solvents used and the rotational velocity of stirring were studied to arrive at an optimal extraction condition.

Key words artemisinin *Artemisia annua* L. extraction processes

青蒿 *Artemisia annua* L. 中含有多种药用成分,它们具有抗菌、抗寄生虫、解热以及促进免疫等作用,且毒性极低,无副作用。青蒿素是含有过氧基团的倍半萜内酯,对脑型及抗氯喹恶性疟疾有特殊疗效。我国及世界各国科学家在青蒿素化学结构的基础上开发出一系列衍生物,其药效大大提高^[1~3]。

青蒿中药用成分提取方法主要有:水蒸气蒸馏法^[4,5],有机溶剂提取法^[6~8],超临界流体提取^[9,10]等。目前青蒿药用成分提取收率低是造成资源浪费

的重要原因。大规模生产中,挥发油主要采用水蒸气蒸馏提取,减压蒸馏分离;非挥发性成分主要采用有机溶剂提取,柱层析及重结晶分离。尽管进行了一些其它提取分离方法研究,如超临界萃取,但由于存在投资大等问题未能用于大规模生产^[11]。

青蒿药用成分多为胞内产物^[12],提取时有效成分从胞内释放,扩散进入提取介质的快慢是影响过程提取率 and 操作成本的主要因素。如果在提取设备

* Address: Zhao Bing, State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, Chinese Academy of Sciences, Beijing

赵 兵 男,博士,生化工程专业,副研究员,主要从事植物天然产物、海藻多糖等提取新技术及工艺设备研究;此外还进行了大规模植物细胞、组织及器官培养、代谢调控生产天然药物研究。现负责海洋“八六三”有关海藻多糖提取新技术研究项目 (819-Q-15),进行国家“九·五”攻关重点项目“植物细胞大规模培养生产青蒿素” (96-C02-03-02)研究,申请专利 10项,已获专利权 5项,在国内外发表论文 50余篇。

** 北京轻工业学院九八届毕业生

△国家“九·五”科技攻关项目 (96-C02-03-02)