

# 柠檬酸铵对紫杉醇生物合成途径的诱导作用研究

朱作君,苗志奇,元英进\*

(天津大学 化工学院 制药工程系,天津 300072)

**摘要:**目的 确定柠檬酸铵在紫杉醇生物代谢途径的作用位点。方法 分别在 0, 0.1, 1, 10, 20  $\mu\text{mol/L}$  的柠檬酸铵诱导下,观察紫杉烷类物质产量的变化,并通过生物代谢途径进行定性分析。结果 紫杉醇的产量提高近 3 倍,而 10-DAB(10-deacetyl baccatin III)与 baccatin III 的浓度下降。结论 柠檬酸铵提高了紫杉醇合成途径中从 baccatin III 与紫杉醇间的反应速度,即其作用位点位于 baccatin III 与紫杉醇之间。

**关键词:**紫杉醇;柠檬酸铵;作用位点;植物细胞培养

中图分类号: TQ461 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)03-0213-03

## Elicitation of taxol biosynthetic pathway by ammonium citrate

WEI Zuo-jun, MIAO Zhi-qi, YUAN Ying-jin

(School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract** **Object** To study the eliciting effect of ammonium citrate (AC) on the yield of taxol. **Methods** The study was carried out on plant cell cultures with different concentrations of added AC. **Results** Yield of taxol was increased by 3 times under 10  $\mu\text{mol/L}$  AC elicitation, while the concentrations of 10-deacetyl baccatin III and baccatin III were simultaneously decreased. **Conclusion** By analyzing the changing characters between substrate and enzyme in the simplified taxol synthetic pathway, AC was considered to play the role in increasing the reaction rate from baccatin III to taxol.

**Key words** taxol; ammonium citrate (AC); acting spot; plant cell culture

人工培养的红豆杉细胞作为紫杉醇生产的微型反应器,最受关注的是如何提高培养体系中紫杉醇的产量。本实验室通过两相培养<sup>[1,2]</sup>、稀土添加<sup>[3]</sup>对紫杉醇产量有显著的提高。生物诱导子和非生物诱导子也可以在一定程度上提高紫杉醇的产量<sup>[4,5]</sup>。

本文研究了柠檬酸铵短期诱导实验中柠檬铵与紫杉醇产量间的相互关系,并分析了诱导实验与对照实验中 10-DAB, baccatin III 的浓度变化趋势以及它们与紫杉醇产量间的相关性。通过拓扑简化将紫杉醇生物合成途径简化为一连串反应,从连串反应动力学的角度,分析柠檬酸铵对各步反应速率的影响,从而获得柠檬酸铵作用位点的相关信息。

### 1 材料与方法

1.1 实验中所采用细胞为中科院植物所提供的南方红豆杉细胞的一个变种 YH,液体悬浮继代培养超过 10 代。

1.2 培养条件:按文献<sup>[6]</sup>。

1.3 诱导子实验设计:实验采用 250 mL 的锥形瓶摇床培养,转速定为 100~120 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。实验用培养基的配制方法为在原 B5 培养基中加入柠檬酸铵。每个实验都采用三个平行组,培养第 6 天、10 天后分别取样,检测细胞的生长量与紫杉醇含量。实验中柠檬酸铵加入浓度如表 1 所示:

表 1 柠檬酸铵诱导实验设计

实验因素	A	B	C	D	E
柠檬酸浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0	0.1	1.0	10	20

1.4 细胞干湿重测定:按文献<sup>[7]</sup>方法。

1.5 紫杉醇的提取与测定:按文献<sup>[7]</sup>方法。

### 2 实验结果分析

图 1 图 2 分别为第 5、10 天取样时紫杉醇合成途径中关键紫杉烷浓度,其中实验编号对应柠檬酸铵浓度见表 1 所示,紫杉醇含量见图右坐标轴。

从图 1 可以看出不同浓度的柠檬酸铵加入对第 5 天的紫杉醇含量影响不大,这说明在柠檬酸铵加入的前 5 d,其对紫杉醇产量的影响还没有充分体现出来。在实验过程中发现加入低浓度柠檬酸铵时细胞生长最快(数据未列出),可能通过某种途径启动

\* 收稿日期: 2000-08-15

基金项目: 国家教委“跨世纪优秀人才培养计划”基金和天津市科委项目资助

作者简介: 朱作君(1976-),男,湖北省京山县人,现在天津大学制药工程系攻读博士学位。从事植物细胞培养研究。

\* 通讯联系人

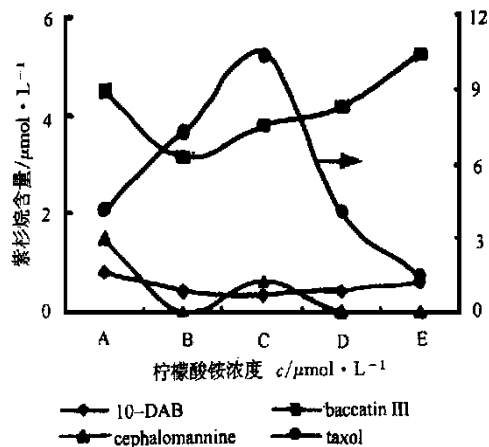


图 1 柠檬酸铵诱导第 5 天紫杉烷浓度

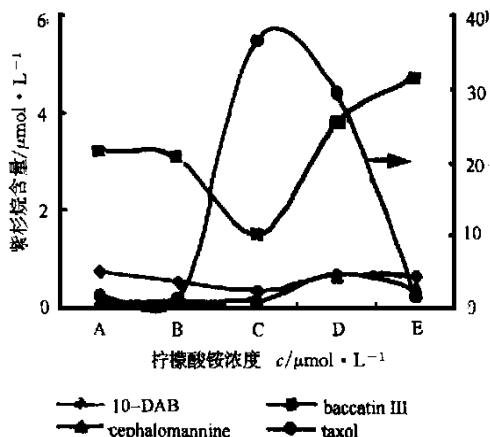


图 2 柠檬酸铵诱导第 10 天紫杉烷浓度

了作为生长抑制剂的紫杉醇的分解途径,因此紫杉醇含量相对于对照组出现下降。当柠檬酸铵浓度超过某一浓度时,细胞生长受到明显抑制,紫杉醇合成途径代谢通量出现提升,但由于作用时间短,反应速率的提升还没有体现到紫杉醇产量的升高上来。

从图 2 中可以明显看出在第 10 天时,柠檬酸铵对紫杉醇产量的影响已经明显体现出来。当柠檬酸铵浓度较低时,紫杉醇的产量近似与柠檬酸铵无关,这可能是由于柠檬酸铵已被消耗完所致;当柠檬酸铵浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$  时,紫杉醇的产量提高到对照组的 3 倍。

另外,分析图 1 图 2 中紫杉醇合成途径中中间代谢产物浓度变化的相关性,可以看出在柠檬酸铵诱导下 10-DAB baccatin III 的含量与紫杉醇的含量呈现出明显的负相关性。 $10 \mu\text{mol/L}$  柠檬酸铵浓度引起 10-DAB baccatin III 含量下降的同时,紫杉醇含量相应上升。这种负相关一方面说明在生物合成途径上 10-DAB baccatin III 是合成紫杉醇的直接或者间接前体,同时也说明适宜浓度的柠檬酸铵可以

对这种关系的具体模式产生影响

### 3 柠檬酸铵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:紫杉醇生物代谢简图如图 3(a)所示。由于该路径非常复杂,涉及的酶代谢产物众多,因此有必要在保持拓扑结构不变的前提下,对该途径进行简化,以适合动力学分析的需要。其拓扑简化途径如图 3(b)所示

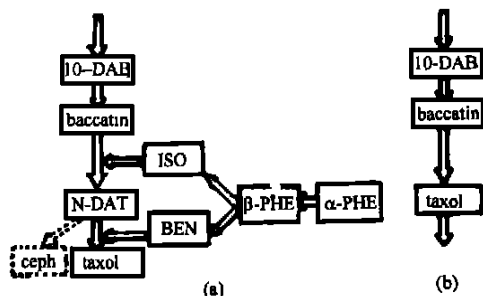


图 3 紫杉醇生物代谢路径及其拓扑结构简化

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 3 种可能:位于 10-DAB 之前、位于 10-DAB 和 baccatin III 之间、位于 baccatin III 与紫杉醇之间。

3.2 紫杉醇生物合成动力学分析:由图 1 图 2 所示,适宜浓度的柠檬酸铵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拟稳态通量,同时 10-DAB, baccatin III 的拟稳态浓度都出现下降。因此分析可知,柠檬酸铵的作用位点位于 baccatin III 和紫杉醇之间,即柠檬酸铵通过提高催化 baccatin III 合成紫杉醇的酶活力,从而提高紫杉醇的产量。而任何假定柠檬酸铵作用在 baccatin III 之间的假设都会与实验中 baccatin III 拟稳态浓度下降的实验现象矛盾。

### 4 讨论

在  $10 \mu\text{mol/L}$  的柠檬酸铵诱导下,紫杉醇的产量提高了近 3 倍,同时 10-DAB 与 baccatin III 的浓度出现下降,与紫杉醇的浓度呈现出一定程度的负相关性。通过动力学分析,指出柠檬酸铵加入提高了从 baccatin III 到紫杉醇间反应的反应速度。

参考文献:

- [1] 吴兆亮,元英进,胡萍,等.东北红豆杉细胞两液相培养生产紫杉醇的研究[J].中草药,1998,29:589-592.
- [2] 吴兆亮,元英进,刘家新,等.南方红豆杉细胞双液相培养中强化紫杉醇生产的研究[J].植物学报,1999,41(10):1108-1113.

- [3] 元英进,胡国武,那平,等.提高红豆杉细胞中紫杉醇含量与释放的方法[P].专利号:1158356.
- [4] Hrasuna J, Pestchanker J, Srinivasan V, *et al.*. Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1996, 44: 95-102.
- [5] Moon W J, Yoo B S, Kim D, *et al.*. Elicitation kinetics of taxane production in suspension cultures of *Taxus baccata* Pendula[J]. *Biotechnology Techniques*, 1998, 12(1): 79-81.
- [6] 未作君,苗志奇,元英进.渗透势及营养物质浓度对南方红豆杉细胞生长和紫杉醇合成的影响[J].无锡轻工业大学学报,1999,18(5): 31-34.
- [7] 元英进,胡国武,王传贵,等.钼、铈对红豆杉细胞生长及紫杉醇合成与释放的影响[J].中国稀土学报,1998,16(1): 56-60.

## 天赐胶囊中多糖的含量测定

毛丽珍,徐世芳,唐红芳\*

(浙江省医学科学院,浙江 杭州 310013)

**摘要:**目的 建立天赐胶囊的含量测定方法。方法 采用苯酚硫酸法,以葡萄糖作为标准品,分光光度法于 490 nm 波长处测定吸光度。结果 多糖的线性范围为 10~ 80  $\mu$ g/mL,相关系数  $r=0.9997$ ,平均加样回收率为 98.67% ( $n=5$ ), $RSD=2.58\%$ ,样品中多糖含量为 267.7~ 300.6 毫克/粒。结论 该法简便、准确,可用于本品的质量控制。

**关键词:** 天赐胶囊;多糖;鲜河蚌肉汁水

中图分类号: R927.2 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)03-0215-02

## Determination of polysaccharide in TIANCI CAPSULE

MAO Li-zhen, XU Shi-fang, Tang Hong-fang

(Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou Zhejiang 310013, China)

**Abstract** **Object** To develop a method for the determination of polysaccharide in TIANCI CAPSULE, which is a new drug dosage form containing the bouillon of fresh water mussels with immunopotentiating activity. **Methods** Total polysaccharide was determined by phenol-sulfuric acid method with glucose as the standard, and spectrophotometer assay absorbency at 490 nm. **Results** The linear range of polysaccharide was 10~ 80  $\mu$ g/mL,  $r=0.9997$ . The average recovery rate was 98.67% ( $n=5$ ),  $RSD=2.58\%$ . Through sample assay, the content of polysaccharide was 267.7~ 300.6 mg in each TIANCI CAPSULE. **Conclusion** The method is simple, rapid and reliable, and may be used for the quality control of this preparation.

**Key words** TIANCI CAPSULE; polysaccharide; fresh water mussel bouillon

天赐胶囊是由鲜河蚌肉汁水经现代工艺制成的胶囊剂。在《本草纲目拾遗》中记载“河蚌水乃真阴天一之精,入药最广”。药效学研究表明,本品有镇痛、增强免疫功能和具有抗疲劳及抗应激功能。临床上有滋阴清热、消肿止痛的作用。适用于阴虚内热、咽燥口干,特别是肿瘤患者术后、放化疗后,对增强体质、提高机体免疫功能更为合适。经理化研究证明,本品主要成分为蚌肉多糖,而蚌肉多糖的含量测定方法未见报道。本文采用苯酚硫酸法<sup>[1-4]</sup>测定其含量,方法简便,结果满意。现报道如下。

### 1 仪器与试药

UV-210 紫外-可见分光光度计(日本岛津),CQ250 超声波清洗器(上海超声波仪器厂),葡萄糖

对照品和浓硫酸(均为分析纯),苯酚试剂(取苯酚 100 g,加铝片 0.1 g 和碳酸氢钠 0.05 g,蒸馏,收集 182℃ 馏分)。天赐胶囊由浙江湖州龙海生化有限公司提供。

### 2 方法与结果

#### 2.1 对照品和供试品溶液的制备

2.1.1 对照品溶液:精密称取 105℃ 干燥至恒重的葡萄糖 100 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,精密量取 2 mL 置 50 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得 0.04 mg/mL 对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液:取本品内容物 0.1 g,精密称定,加水 1 mL,超声处理 5 min 使溶解,加入无水乙醇 3 mL,放置 10 min,离心弃去上清液,沉淀加水溶