

剪切力对南方红豆杉细胞悬浮培养的影响

韩荣斌, 施中东, 杨文莉, 元英进

(天津大学化工学院制药工程系, 天津 300072)

摘要:考察了流体剪切力对南方红豆杉悬浮细胞线粒体活性、膜透性、培养液 pH、酚积累以及氧迸发等的影响。结果表明,指数后期或稳定前期的南方红豆杉细胞对剪切力更为敏感,细胞生物活性丧失较大,次生代谢物酚的积累更多;此外,剪切力还引起了红豆杉细胞的防御应答反应,如 H^+ 内流、酚类物质大量积累以及活性氧迸发。

关键词:南方红豆杉细胞;悬浮培养;剪切力;细胞防御应答反应

中图分类号: Q942.6 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2003)02-0135-06

1 前言

植物细胞因其个体大、细胞壁僵硬和具有大的液泡而对剪切敏感,成为植物细胞培养放大的一个主要限制因素。弄清植物细胞对培养体系流体力学敏感性的调控机理^[1]对植物细胞培养设计合理的反应器和优化操作条件具有重要的作用。

植物细胞对流体力学环境的响应依赖于所施加条件的时间和强度以及细胞本身的生理特性^[2]。在实际的反应器培养中尚无法定量剪切力与细胞生理响应之间的关系。因而使用确定的剪切场,研究一定时间内剪切力与细胞响应之间的关系^[1]对植物细胞的剪切敏感性的研究显得十分必要。

此外,植物细胞对外界环境的胁迫有着快速的响应,经由信号传导途径引发活性氧迸发和加强次生代谢等来应对环境的改变^[3,4]。而作为一种机械胁迫因子的剪切力,是否也将导致植物细胞产生类似的防御应答反应,是值得进一步研究的问题。

本文用一种 Couette 式剪切反应器为南方红豆杉细胞(*Taxus chinensis* var. *mairei*)提供近似均匀的流体剪切流场,在此基础上考察了剪切力对不同生长期的南方红豆杉细胞的生物活性与次生代谢的影响,分析了剪切力与南方红豆杉细胞防御应答反应之间的联系,以期为南方红豆杉细胞悬浮培养生产紫杉醇的放大以及植物细胞剪切敏感性机理的研究提供一定的参考。

2 材料与方法

2.1 细胞系与维持

实验中所用细胞为中国科学院北京植物研究所提供的南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairei*)细胞株系。细胞培养于含有 100 ml 改良 B₅ 培养基[内含萘乙酸(NAA)1 mg/L,6-苄基-嘌呤(6-BA)0.5 mg/L,水解酪蛋白 1 g/L,蔗糖 25 g/L,琼脂 9 g/L]的 500 ml 摇瓶中,转速为 110 r/min,25°C 黑暗培养,每 10 d 换液 1 次。

2.2 剪切装置与处理

采用内圆柱半径 $R=55$ mm、环隙宽 $\delta=5$ mm、高为 160 mm 的 Couette 式剪切反应器^[1,5](图 1),

收稿日期: 2002-11-04, 修回日期: 2003-01-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20176038)

作者简介: 韩荣斌(1979-), 男, 陕西省宝鸡市人, 硕士研究生, 制药工程专业。

在环隙间提供近似均匀的剪切流场. 为便于表征, 剪切力 τ 由下面的方程估算^[5]:

$$\tau = 2\pi\mu RN/\delta \text{ (N/m}^2\text{)},$$

其中 N 为转速(s^{-1}), μ 为悬浮液粘度($\text{N}\cdot\text{s/m}^2$), 由 Curtis 与 Emery^[6] 所提出的关联式计算:

$$\mu = (1 + 2.5\Phi + 10.05\Phi^2 + 247\Phi^3 + 2150\Phi^5)\mu_0,$$

其中 μ_0 为培养基粘度, Φ 为鲜细胞占整个培养物的体积分数.

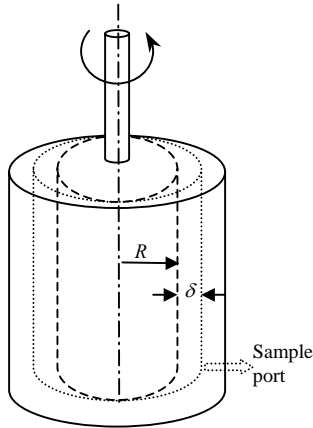


图 1 Couette 式剪切反应器
Fig.1 Couette-type shear reactor

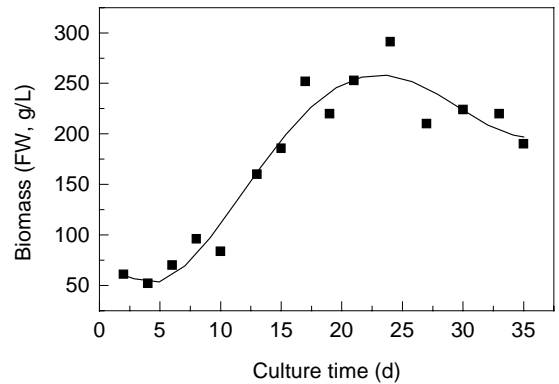


图 2 南方红豆杉细胞生长曲线
Fig.2 The growth curve of suspension cultures of *T. chinensis* var. *mairei*

剪切反应器在灭过菌的环境中运行, 温度维持在 25°C , 实验中转速为 450 r/min , 对应的剪切力为 1.21 Pa . 为考察剪切力对红豆杉细胞生理生化水平的影响, 直接将摇瓶中处于延滞期(2 d)、指数期(9 d)以及指数后期(16 d)生长期的悬浮培养细胞接种于剪切装置中(接种体积为 100 ml , Φ 约为 0.15). 图 2 为南方红豆杉悬浮培养细胞的生长曲线, 可以看出, 培养开始的前 5 d 为延滞期, 5~18 d 为对数生长期, 18 d 后进入静止期.

2.3 实验参数的测定

在设定的时间点从剪切反应器中取样 15 ml , 用于实验参数的测定.

2.3.1 细胞生物量及湿干比的测定

样品用布氏漏斗抽滤至一定真空度后, 称取一定量的鲜细胞, 新鲜细胞经 -50°C 冷冻干燥后称其干重, 鲜重(FW)与干重(DW)之比即湿干比(FW/DW).

2.3.2 细胞线粒体活性的测定

线粒体活性的测定采用 Towill 和 Mazur 的 TTC 法^[7].

2.3.3 细胞膜完整性/通透性的测定

膜的通透性采用伊文思蓝(Evans blue)染色法测定^[8]. 用 1% 的伊文思蓝溶液 0.5 ml 将细胞染色 5 min 后, 用培养液清洗细胞 5 遍以去除过量的染料. 再用 50% 甲醇/1% SDS 于 50°C 温度下水浴 30 min 以抽提蓝色染料, 检测 OD_{600} . 通透性以单位质量鲜细胞样品的吸光度表示. 数值越大, 表明完整性越差, 通透性越大.

2.3.4 培养液 pH 的测定

采用 PHS-2 型精密酸度计(上海雷磁仪表厂)测定.

2.3.5 培养液酚积累的检测

先用乙酸乙酯萃取酚,自然风干后,以 75%的乙醇溶解并在 280 nm 下测量其吸光度^[9].

2.3.6 胞内总活性氧(ROS)含量的监测^[9]

细胞经冷冻干燥后,用 ESR-SPECTROMETER 检测其顺磁共振图谱,以 MnO_2 为标准校准磁场.测定条件为:微波功率 1 mW,扫场时间 8 min/360 mm,调制幅度 2G,响应时间 0.01 s,调制频率 100 kHz.以每毫克干细胞引起的 ESR 信号强度的绝对值表示细胞内总活性氧的相对含量.

3 结果与讨论

3.1 剪切力对不同生长期的南方红豆杉细胞的影响

3.1.1 剪切力对不同生长期的南方红豆杉细胞生物活性的影响

(1) 剪切力对细胞线粒体活性的影响

如图 3 所示,在剪切力作用下,处于延滞期(2 d)、指数期(9 d)以及指数后期(16 d)的南方红豆杉细胞在 0~120 min 内线粒体活性均随着剪切时间的增加而持续下降,并且在施加剪切力的初始 60 min 内细胞线粒体活性下降较为迅速,而后细胞线粒体活性随时间下降的幅度逐渐趋缓.另一方面,在剪切作用 120 min 时,延滞期、指数期以及指数后期的细胞线粒体活性分别降为未受剪切的细胞活性的 75%、55%和 35%.即在相同的剪切力作用条件下,不同生长期的南方红豆杉细胞线粒体活性不同,处于指数后期或稳定前期的南方红豆杉细胞对剪切力的损伤刺激更为敏感.

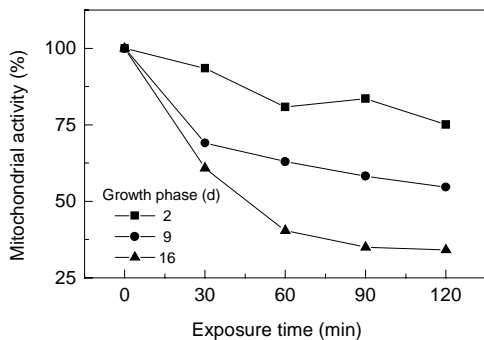


图 3 剪切力对不同生长期的南方红豆杉细胞生物活性的影响

Fig.3 Effect of shear stress on the mitochondrial activity of suspension cultures in different growth phases

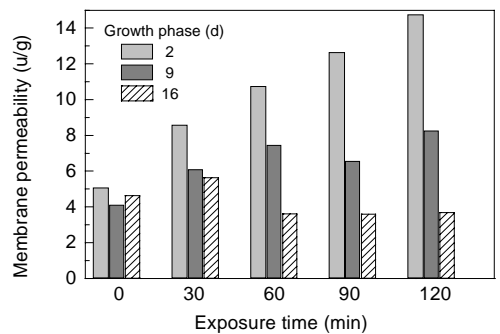


图 4 剪切力对细胞膜通透性的影响

Fig.4 Effect of shear stress on membrane permeability

(2) 剪切力对细胞膜通透性与湿干比的影响

如图 4 所示,在剪切力作用 120 min 内,处于延滞期的南方红豆杉细胞膜通透性增加了近 3 倍;指数期的细胞膜通透性增加幅度相对较小(约 2 倍);指数后期的南方红豆杉细胞在剪切作用后,显微镜下观察到大量的细胞碎片出现,并且培养液出现较严重的褐化现象.而伊文思蓝染色所得数值却降低.这个矛盾可能是该检测方法的缺陷造成的.因为在剪切作用下大量的细胞发生破碎,所取样品中含有大量细胞碎片,碎片不能被染色,就会使所测样品的吸光度偏低.

细胞膜通透性的改变会影响胞内外物质的交流或胞内物质的释放量,必将影响细胞的湿干比(FW/DW)。如图 5 所示,延滞期细胞的湿干比变化幅度不大;指数期细胞的湿干比呈下降趋势,剪切力对其影响的程度相对较大。因而指数后期或稳定前期的细胞比延滞期或指数生长初期的细胞对流体剪切力更为敏感,更易受到剪切力的损伤。其机理一般认为与细胞的生长历程有关。

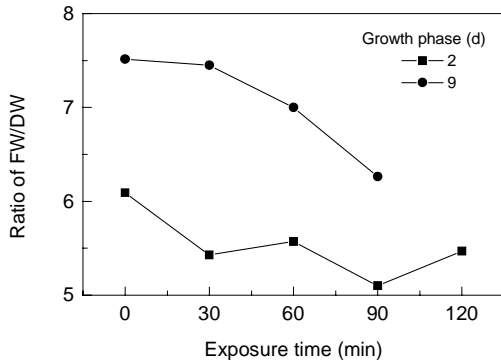


图 5 剪切力对细胞湿干比的影响

Fig.5 Effect of shear stress on FW/DW ratio

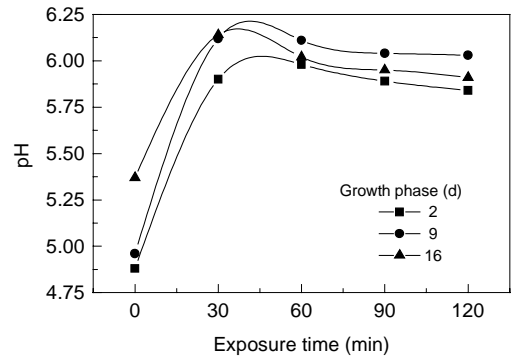


图 6 剪切力对细胞培养液 pH 的影响

Fig.6 Effect of shear stress on pH in medium

3.1.2 剪切力对不同生长期的南方红豆杉细胞代谢的影响

(1) 剪切力对细胞培养液 pH 的影响

由图 6 可见,在剪切作用的 0~30 min 内,处于三个生长期的细胞悬浮液 pH 均有一定的上升,但是上升的幅度并不相同。延滞期与指数期的细胞培养液 pH 分别上升了 1.02 和 1.16,而指数后期或稳定前期的细胞培养液 pH 仅上升 0.77。此外,在剪切作用的 30~120 min 间,培养液 pH 均出现略呈下降的平台状态,而稳定前期的培养液 pH 下降的趋势更为明显。

造成培养液中 pH 先快速上升后又平稳或略微下降的原因,可能与细胞膜上 H^+ 通道的打开、调控、以及 H^+ 内流有关^[10]。而不同生长期细胞培养液 pH 变化幅度差异的原因应该主要在于不同生长期细胞的剪切敏感性的差异。

(2) 剪切力对培养液中酚积累的影响

由图 7 可见,延滞期的南方红豆杉细胞培养液中酚类物质的积累在剪切作用的 120 min 内一直是逐渐增大的,但增幅相对不高,在 120 min 后就趋于平稳。指数期与指数后期的细胞培养液中酚类物质的积累相似,都是在前 60 min 内就达到最高峰,此后均保持一平台状态。而在相同的剪切力作用条件下指数后期细胞培养液的酚积累量更多。表明处于指数后期的南方红豆杉细胞对剪切力的损伤刺激表现得更敏感些。剪切力作为一种环境刺激因子,会诱导南方红豆杉细胞 PAL 酶活性的增加^[11],从而使苯丙烷代谢途径加强,导致酚类物质的积累,以加强细胞防御反应,抵御外界的不良胁迫^[12]。

3.2 剪切力与南方红豆杉细胞的防御应答响应

植物细胞为应付各种生物胁迫与非生物胁迫的刺激,会迅速诱导 $[Ca^{2+}]$ 增加和 pH 变化^[13],甚至诱导活性氧迸发以减轻环境变化所带来的伤害。作为第二信使的 Ca^{2+} , H^+ 以及 H_2O_2 等浓度的变化又必然会导致细胞一系列的生理响应^[14,15]。

在剪切力的机械刺激下,南方红豆杉细胞出现了氧迸发(图 8),说明剪切力诱导了南方红豆杉细胞防御应答反应,影响了活性氧在胞内的存在状态。目前,人们普遍认为植物具有一种先天的“免

疫系统”一氧迸发(oxidative burst, OXB),即植物细胞在胁迫条件下能迅速产生一些活性氧分子(AOS),进而启动体内其他信号级联过程(signal cascades),引起过敏反应^[16],强化细胞壁^[17],诱导酚类物质的积累、植保素的合成^[18]以及作为第二信使诱导防御基因表达^[19].同时在剪切力的机械刺激下,南方红豆杉细胞发生了 H^+ 内流(图6)以及酚积累(图7),也可说明剪切力诱导了南方红豆杉细胞防御应答反应.

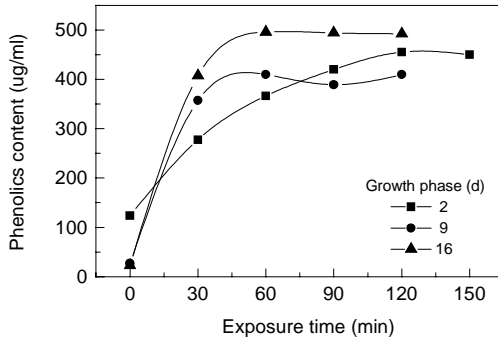


图7 剪切力对培养液中酚积累的影响
Fig.7 Effect of shear stress on accumulation of phenolics in medium

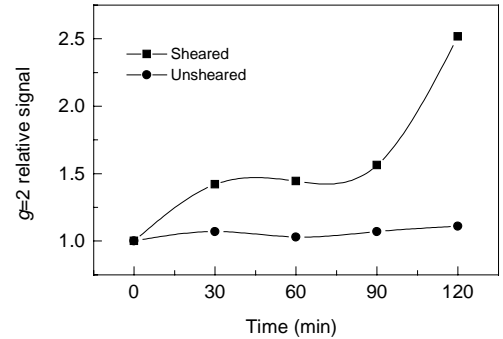


图8 剪切力诱导的指数期南方红豆杉细胞氧迸发
Fig.8 Shear-induced OXB of *T. chinensis* var. *mairei* cells in the exponential phase

4 结论

(1) 指数后期或稳定前期的南方红豆杉细胞对剪切力更为敏感,细胞线粒体活性丧失较大,次生代谢物酚的积累更多.指数期细胞湿干比有明显下降趋势.

(2) 剪切力诱导了红豆杉细胞的防御应答反应.培养液发生碱化、 H^+ 内流,出现了活性氧迸发以及酚类物质的积累.

参考文献:

- [1] Dunlop E H, Namdev P K, Rosenberg M Z. Effect of Fluid Shear Forces on Plant Cell Suspensions [J]. Chem. Eng. Sci., 1994, 49(14): 2263-2276.
- [2] Kieran P M, MacLoughlin P F, Malone D M. Plant Cell Suspension Cultures: Some Engineering Considerations [J]. J. Biotechnol., 1997, 59(1): 39-52.
- [3] 张长平, 李春, 元英进. 真菌诱导子对悬浮培养南方红豆杉细胞次生代谢的影响 [J]. 化工学报, 2002, 53(5): 498-502.
- [4] 张长平, 李春, 元英进. 真菌诱导子对悬浮培养南方红豆杉细胞态势及紫杉醇合成的影响 [J]. 生物工程学报, 2001, 17(4): 436-440.
- [5] Hooker B S, Lee J M, An G. Response of Plant Tissue Culture to a High Shear Environment [J]. Enzyme Microb. Technol., 1989, 11(5): 484-490.
- [6] Curtis W R, Emery A H. Plant Cell Suspension Culture Rheology [J]. Biotechnol. Bioeng., 1993, 42(6): 520-526.
- [7] Towill L E, Mazur P. Studies on the Reduction of 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride as a Viability Assay for Plant Tissue Cultures [J]. Can. J. Bot., 1975, 53(7): 1097-1102.
- [8] Suzuki K, Yano A, Shinshi H. Slow and Prolonged Activation of the p47 Protein Kinase during Hypersensitive Cell Death in a Culture of Tobacco Cells [J]. Plant Physiol., 1999, 119(4): 1465-1472.
- [9] Anderson A J, Roger K, Teeper C S. Timing of Molecular Events Following Elicitor Treatment of Plant Cells [J]. Physiol. Mol. Plant Pathol., 1991, 38(1): 1-13.
- [10] Namdev P K, Dunlop E H. Shear Sensitivity of Plant Cell Suspension, Present and Future [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 1995, 54(2): 109-131.

- [11] 商桂敏, 施中东, 元英进. 剪切应力对红豆杉细胞悬浮培养的影响及CFD模拟研究 [J]. 高校化学工程学报, 2002, 16(5): 542–547.
- [12] Dixon R A, Paiva N L. Stress-induced Phenylpropanoid Metabolism [J]. Plant Cell, 1995, 7: 1085–1097.
- [13] Kurkdjian A, Guern J. Intracellular pH: Measurement and Importance in Cell Activity [J]. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1989, 40: 271–303.
- [14] Lichtenthaler H K. The Stress Concept in Plants: An Introduction [J]. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1998, 351: 187–198.
- [15] Chen S Y, Huang S Y. Shear Stress Effects on Cell Growth and L-DOPA Production by Suspension Culture of *Stizolobium hassjo* Cells in an Agitated Bioreactor [J]. Bioprocess Eng., 2000, 22(1): 5–12.
- [16] Lamb C, Dixon R A. The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance [J]. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1997, 48: 251–275.
- [17] Brisson L F, Tenhaken R, Lamb C J. Function of Oxidative Cross-linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance [J]. Plant Cell, 1994, 6: 1703–1712.
- [18] Apostol I, Heinstejn P F, Low P S. Rapid Stimulation of an Oxidative Burst during Elicitation of Cultured Plant Cells [J]. Plant Physiol., 1989, 90(1): 109–116.
- [19] Jabs T, Tschope M, Colling C, et al. Elicitor-stimulated Ion Fluxes and O_2^- from the Oxidative Burst are Essential Components in Triggering Defense Gene Activation and Phytoalexin Synthesis in Parsley [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94(9): 4800–4805.

Effect of Shear Stress on Suspension Cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*

HAN Rong-bin, SHI Zhong-dong, YANG Wen-li, YUAN Ying-jin

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering & Technology,
Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Defined laminar shear field was created for the suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* in a Couette-type shear reactor. It was found that the suspension cultures in the latter stage of exponential growth and early in the stationary phase were more susceptible to shear damage than cultures in the lag phase and early exponential phase, resulting in the most loss of the cell viability and the most accumulation of phenolics. Additionally, the shear stress caused the defense responses of *Taxus chinensis* var. *mairei* such as influx of H^+ , accumulation of phenolics and oxidative burst.

Key words: suspension culture; shear stress; defense responses