

酸胁迫作用下悬浮培养红豆杉细胞的磁场生物学效应

范寰, 商桂敏, 元英进

(天津大学化工学院制药工程系, 天津 300072)

摘要: 研究了直流稳恒磁场对酸胁迫作用下悬浮培养南方红豆杉细胞生长和代谢的影响. 结果表明, 磁场提高了红豆杉细胞的抗酸胁迫能力, 细胞活力上升, 生物量和蛋白含量明显升高, 胞外多酚氧化酶(PPO)活力升高, 酚类物质积累受到抑制. 在一定浓度的盐酸作用下细胞受到的酸胁迫越大, 磁场的生物学效应越明显. 胞外 pH 值和电导率的变化说明磁场提高细胞抗酸胁迫的能力与其加速了物质的跨膜转运有关.

关键词: 直流稳恒磁场; 南方红豆杉细胞; 酸胁迫; 跨膜运输

中图分类号: Q64 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2005)03-0345-04

1 前言

红豆杉细胞悬浮培养生产具有独特抗癌活性的药物—紫杉醇是解决其药源危机的重要手段, 成为近年来国内外研究的热点^[1]. 但在红豆杉细胞培养过程中存在很多问题, 从而导致其工业化生产的困难, 其中一点就是细胞对外界环境的敏感性. 外界环境的改变会导致细胞生长、代谢发生明显变化. 例如, 0.16 Pa 的剪切应力下红豆杉细胞生长良好, 当剪切应力升高至 0.78 Pa 时, 细胞活性快速下降, 剪切对细胞造成明显损伤^[2]. 细胞培养液中加入过量酸性物质, 会导致细胞生长状态恶化, 生物量大幅度降低. 因此, 提高细胞的抗逆性对于植物细胞的大规模培养具有重要意义^[3,4].

人们在研究磁场促进生长的同时, 发现磁场可提高植物的抗逆性. 夏丽华等^[5]研究了磁场对羊草种子萌发的影响, 发现磁场处理不仅促进了羊草的生长, 还提高了羊草的抗盐碱性和过氧化氢酶的活性. 刁岗等^[6]研究了磁场对小麦氧自由基清除酶系的影响, 发现干旱胁迫下, 经磁场处理的幼苗叶片细胞中的保护酶系统的功能有所增加. 由此, 本工作将磁场应用于红豆杉细胞体系, 初步探讨了其对细胞抗逆性的影响, 以期为大規模培养提供新的策略.

2 材料与方法

2.1 细胞株系及培养

细胞株系为南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairei*)Y 系, 于 25℃ 及 110 r/min、黑暗条件下振荡培养. 采用改良的 B5 液体培养基[含萘乙酸 (NAA) 2 mg/L、6-苄基-嘌呤(6-BA) 0.5 mg/L、酸水解酪蛋白

(CA) 1 g/L、蔗糖 30 g/L]^[7]继代培养 5 代以上作为细胞种子. 将细胞种子 1 g 接种于装有 25 mL 新鲜培养液的 100 mL 三角瓶中作为实验材料. 在细胞生长的第 10 天加入不同量的浓度为 1 mol/L 的盐酸溶液, 并将其放入磁场($B=3.5$ mT)中, 同时以未加盐酸溶液的同批细胞为空白对照, 在放入磁场后 0, 2, 4, 6, 8 d 取样检测.

盐酸用量的选择: 由预实验发现, 当盐酸用量 > 20 μ L 时, 细胞活力下降较为显著. 当盐酸用量 > 50 μ L 时细胞无活力. 因此, 选择的盐酸用量分别为 20 μ L (Low HCl) 和 50 μ L (High HCl).

2.2 磁场装置

本实验采用自制磁场装置, 主要由螺线管、屏蔽罩、调压器和整流器组成. 其中螺线管直径 20 cm, 高 25 cm, 漆包铜线直径 0.59 mm. 接入 220 V, 50 Hz 交流电, 经桥式整流形成直流稳恒磁场, 控制调压器使磁场强度保持在 3.5 mT, 磁场强度由 CT3-A 型特斯拉计测定. 实验过程中通入冷凝水将温度控制在 (25 ± 1) ℃.

2.3 细胞活力的测定

细胞活力测定采用氯化三苯四氮唑(TTC)还原法^[8]. 称取 10 mg 抽滤的新鲜细胞, 加 TTC 溶液(TTC 0.6 g 溶于 100 mL 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液, pH 7.5) 3 mL; 22℃ 下培育 12~18 h; 吸去 TTC 溶液, 用蒸馏水清洗 2~3 次, 吸去水溶液. 收集细胞, 加入 95%乙醇 3 mL, 60℃ 水浴 10 min; 冷却, 摇匀, 取抽提液于 485 nm 下测吸光度.

2.4 细胞生物量的测定

将一定量的培养液在布氏漏斗上抽滤, 所得细胞用滤纸吸取多余水分, 称其质量为细胞湿重或鲜重(Fresh Weight, FW).

收稿日期: 2004-05-14, 修回日期: 2004-07-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20236040)

作者简介: 范寰(1971-), 女, 河北省平山县人, 博士研究生, 生物化工专业; 元英进, 通讯联系人, E-mail: yjyuan@tju.edu.cn.

2.5 胞内蛋白质含量的测定

取 300 mg 抽滤后的新鲜细胞, 加入 0.01 g 聚乙烯吡咯烷酮和少量石英砂, 在研钵中于 4℃ 研磨破碎细胞, 随后加入 3 mL 预冷的酶提取液(含 0.2 mmol/L 乙二胺四乙酸, 0.4 mmol/L 二硫苏糖醇). 低温(4℃), 约 9200 g 离心 20 min 后取上清液作为胞内蛋白待测液. 采用考马斯亮蓝染色法, 取 30 μL 待测液, 加入 170 μL 考马斯亮蓝染色液, 酶标仪 571 nm 测定, 以考马斯亮蓝染色液为对照.

2.6 胞外多酚氧化酶(PPO)酶活力的测定

布氏漏斗抽滤细胞培养液, 取 50 μL 滤液, 加入 50 μL 邻苯二酚反应液(0.02 mol/L 邻苯二酚溶于 0.05 mol/L pH 6.0 的磷酸缓冲液)和 100 μL 0.05 mol/L pH 6.0 的磷酸缓冲液, 酶标仪 407 nm 测定, 每隔 2 min 读数, 以磷酸缓冲液为对照. $\Delta A_{407}/\Delta t=0.01 \text{ s}^{-1}$ (每秒 407 nm 处吸光度的变化值)为一个酶活单位.

2.7 酚类积累的检测

布氏漏斗抽滤细胞培养液, 取 2 mL 滤液, 加入 10 mL 乙酸乙酯, 超声振荡后静止萃取 2 h. 取 5 mL 乙酸乙酯相(上相)自然风干后, 残留物溶于 3 mL 75% 的乙醇中, 紫外分光光度计 280 nm 下测量其吸光度值, 以 3 mL 75% 的乙醇为空白对照.

2.8 培养液 pH 值和电导率的测定

采用 DDS-307 电导率仪(上海雷磁仪表厂)测定培养液电导率, 胞外 pH 值采用精密 pH 计(pH-2, 上海雷磁仪表厂)测定.

3 结果与讨论

3.1 磁场对酸胁迫作用下细胞活力的影响

图 1 是不同条件下细胞活力随时间的变化规律. 由图可知, 加入不同量盐酸均使细胞活力明显降低; 在考察的前 6 d, 盐酸胁迫作用下的细胞活力均低于对照组. 在考察的第 8 天, 对照组细胞活力明显下降, 而低酸胁迫作用下细胞活力只有较小幅度的降低, 高酸胁迫作用下的细胞活力仍处于上升态势.

图 2 为磁场作用下酸处理组细胞活力与未经磁场作用的同等条件酸处理组活力的差值随时间的变化. 可见磁场对两种情况下细胞活力的影响均符合二次多项式的关系.

比较不同用量盐酸作用下磁场的生物学效应可以发现, 磁场对高酸胁迫作用下细胞活力的影响, 无论是前 6 d 的正效应和后 2 d 的负效应作用, 均比低酸胁迫作用下强, 正效应约为低酸胁迫下的 1.34 倍, 负效应约为 1.98 倍. 这说明在一定的酸胁迫浓度下酸胁迫浓度越

高, 磁效应越明显, 这与夏丽华等^[5]的研究结果相符.

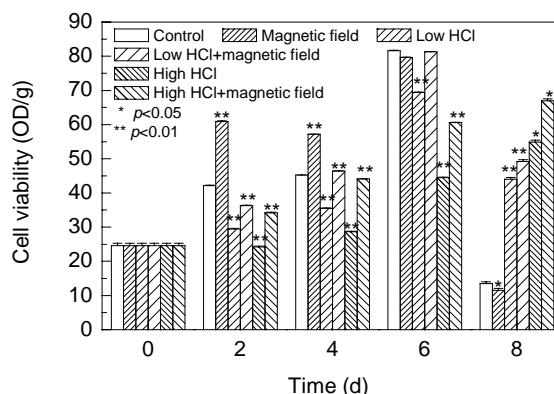


图 1 磁场对细胞活力的影响

Fig.1 Effect of magnetic field on cell viability

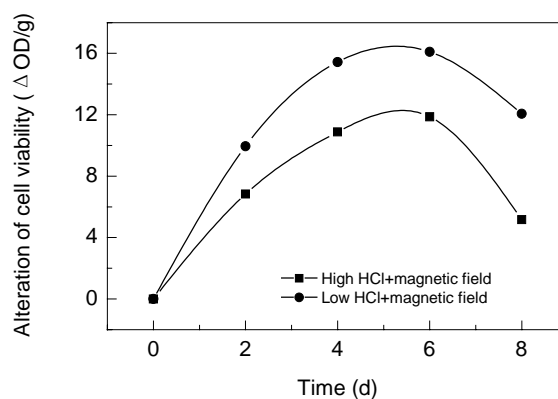


图 2 磁场作用下细胞活力的改变值随时间的变化

Fig.2 Alteration of cell viability in magnetic field with time

3.2 磁场对酸胁迫作用下细胞生物量的影响

图 3 为不同条件下细胞生物量随时间的变化规律, 可以看出加入不同量盐酸确实使细胞生长发生延迟, 这与细胞活力的变化规律相符. 对照组细胞处于指数生长旺盛期时, 盐酸胁迫作用下的细胞几乎没有生长, 生物量甚至有所下降. 结合细胞活力的变化规律, 确定考察的前 4 d 是细胞自身调节期, 在此期间细胞启动自身调节机制, 逐渐适应外界环境. 第 4 天后, 细胞活力复苏, 进入生长旺盛期, 细胞生物量不断增加.

比较磁场对不同酸量胁迫作用下细胞生物量的影响效果, 发现调节期后低酸胁迫细胞受磁场作用后细胞生物量的提高率最大为 23%, 而高酸胁迫细胞则最大为 37%, 说明在此实验中高酸胁迫作用下磁场的生物学效应更为显著, 这与磁场对细胞活力的影响结果相符.

3.3 磁场对酸胁迫作用下胞内蛋白含量的影响

图 4 显示了不同条件下细胞胞内蛋白随时间的变化趋势. 结果表明, 正常培养条件下, 磁场作用的细胞

胞内蛋白含量最大为对照组蛋白的 1.87 倍, 出现在磁场作用后的第 2 天; 而酸胁迫条件下, 该值则分别减至 1.25 倍(Low HCl)和 1.77 倍(High HCl), 且时间推后, 出现在磁场作用后的第 4 天. 结合前面对细胞活力和生

物量的实验结果分析, 可以认为磁场对细胞胞内蛋白影响能力降低, 是因为磁场所提供的能量更多地消耗于细胞调节自身适应外界环境的反应中, 用于合成蛋白的能量降低.

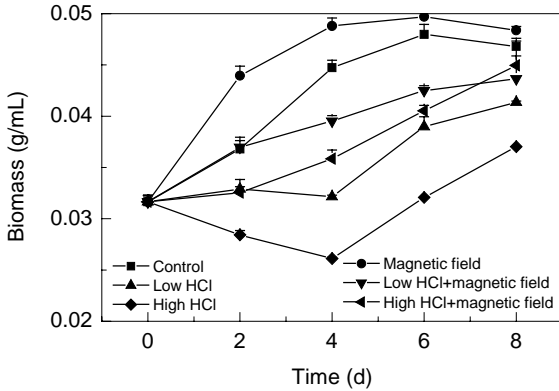


图 3 磁场对细胞生物量的影响
Fig.3 Effect of magnetic field on cell biomass

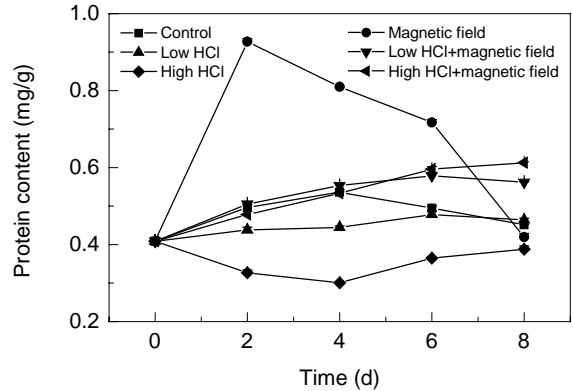


图 4 磁场对胞内蛋白含量的影响
Fig.4 Effect of magnetic field on intracellular protein content

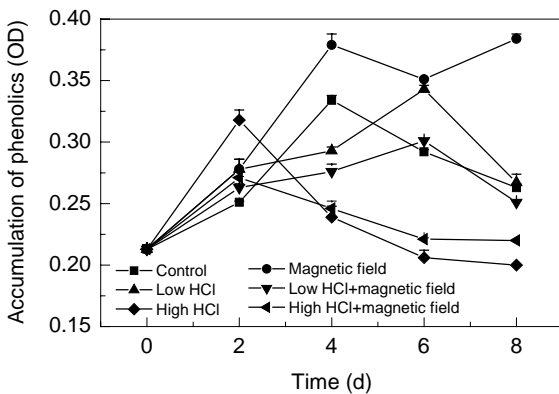


图 5 磁场对胞外酚积累的影响
Fig.5 Effect of magnetic field on extracellular phenolics

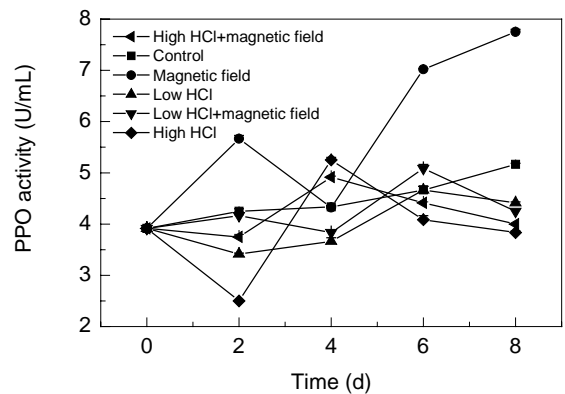


图 6 磁场对胞外 PPO 活力的影响
Fig.6 Effect of magnetic field on extracellular PPO activity

3.4 磁场对酸胁迫作用下胞外酚积累和 PPO 活力的影响

图 5 是胞外酚积累随时间的变化规律. 结果显示, 低酸胁迫下胞外酚积累较对照没有发生明显变化, 只是最大值出现的时间推后, 而高酸胁迫作用下, 酚积累瞬时增高, 并持续 2 d 左右, 随后酚积累含量降低. 胞外 PPO 酶活的变化规律(图 6)显示, 低酸胁迫在一定程度上抑制了细胞胞外 PPO 酶活, 但影响幅度较小. 而高酸胁迫作用的前 2 d, 胞外 PPO 酶活显著降低, 这也解释了该情况下细胞胞外酚大量积累的原因.

考察磁场对酸胁迫作用下胞外 PPO 活力的影响, 可以看出磁场提高了低酸胁迫下 PPO 活力, 这与磁场作用下胞外酚含量受到抑制相吻合; 高酸胁迫下细胞受到磁场作用后, 前 2 d 胞外 PPO 活力明显高于高酸胁迫下未放入磁场的处理组, 这也解释了该期间磁场作用下

的胞外酚含量低于高酸胁迫下未放入磁场处理组的原因. 由此可以看出, 磁场对酸胁迫下细胞次级代谢的影响明显低于未加酸胁迫时的影响, 这可能是因为细胞受到酸胁迫作用, 次级代谢水平降低, 因而磁场对其影响强度也相应降低.

3.5 磁场对酸胁迫作用下培养液 pH 值和电导率的影响

不同条件下细胞培养液 pH 值和电导率的变化规律如图 7, 8 所示. 由图 7 可以看出, 加入不同量的盐酸均使细胞培养液 pH 值瞬时下降, 随后又均逐步回升. 从第 4 天开始 pH 值保持恒定, 一直到考察期结束. 从前面的分析可知, 考察期的前 4 d 是细胞自我调节期, 而 pH 值的变化规律也得到同样的结论; 并发现磁场对高酸胁迫作用下培养液 pH 值的影响明显强于对低酸胁迫下 pH 值的影响.

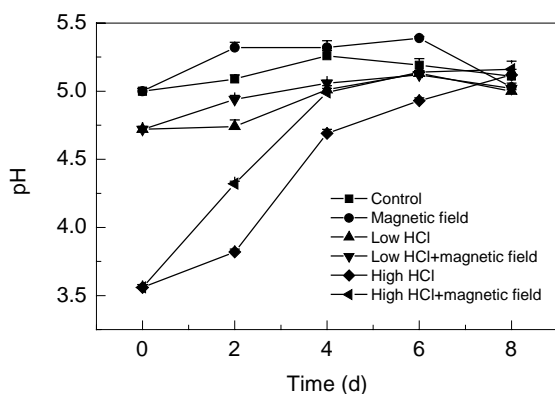


图7 磁场对培养液 pH 的影响
Fig.7 Effect of magnetic field on extracellular pH

由图 8 看到, 两种不同用量盐酸处理的细胞培养液电导率开始均呈现下降趋势, 并最终降至对照组以下. 这一结果说明, 盐酸加入后, 胞外 H^+ 确实进入胞内. 从第 2 天开始培养液电导率逐渐上升, 表明在细胞自我调节期间, 也存在胞内碱性物质向胞外的分泌. 从第 4 天开始, 细胞进入正常生长状态, 电导率的变化与正常培养细胞电导率变化相同. 考察磁场对细胞培养液电导率的影响, 看到无论是胞外 H^+ 进入胞内, 还是胞内碱性物质向胞外的分泌, 磁场的作用均使其得到加速. 磁场加速离子的跨膜运输, 很可能是磁场增强红豆杉细胞抗酸胁迫能力的原因之一.

4 结论

研究了一定盐酸浓度下磁场对酸胁迫作用下红豆杉细胞活力及生物量的作用规律. 结果表明, 磁场提高了红豆杉细胞的抗酸胁迫能力、细胞活力、生物量和胞内蛋白含量. 磁场对酸胁迫下的细胞次级代谢影响明显低于未加酸胁迫的处理组, 这可能是因为细胞受到酸胁迫作用后, 次级代谢水平降低, 因而磁场对其影响强度也相应降低; 胞外培养液电导率和 pH 值的变化说

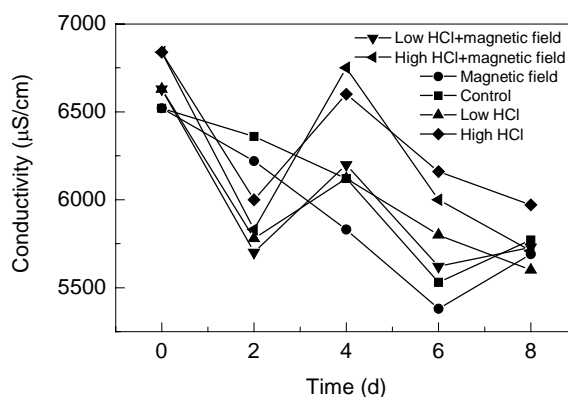


图8 磁场对培养液电导率的影响
Fig.8 Effect of magnetic field on extracellular conductivity

明, 酸胁迫作用下细胞的物质跨膜运输更易受磁场影响, 使细胞更快适应外界环境. 研究表明在一定浓度的盐酸作用下, 细胞受到的酸胁迫越大, 其磁场生物学效应也就越明显.

参考文献:

- [1] Yuan Y J, Li J C, Ge Z Q, et al. Superoxide Anion Burst and Taxol Production Induced by Ce^{4+} in Suspension Cultures of *Taxus cuspidate* [J]. J. Mol. Catal. B: Enzym., 2002, 18: 251-260.
- [2] Shi Z D, Yuan Y J, Wu J C, et al. Biological Responses of Suspension Cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* to Shear Stresses in the Short Term [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2003, 110(2): 61-74.
- [3] 李如铁, 沈惠娟, 李梅枝. 酸胁迫对几种林木体内脯氨酸及腐胺含量的影响 [J]. 南京林业大学学报, 1995, 19(3): 88-93.
- [4] 谢寅峰, 沈惠娟, 李梅枝. 酸胁迫对林木内源多胺及其活性氧代谢的影响 [J]. 林业科学, 1991, 35(1): 117-121.
- [5] 夏丽华, 郭继勋. 磁场对羊草过氧化物酶的激活效应及同工酶分析 [J]. 应用生态学报, 2000, 11(5): 699-702.
- [6] 刁岗, 傅志东. 外磁场对小麦萌芽期过氧化物酶合成的影响及其激活效应 [J]. 植物生理学报, 1993, 19(2): 155-161.
- [7] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 374-375.
- [8] Towill L E, Mazur P. Studies on the Reduction of 2,3,5-Tripheltetrazolium Chloride as a Viability Assay for Plant Tissue Culture [J]. Can. J. Bot., 1975, 53(7): 1097-1102.

Bio-effect of Magnetic Field on Suspension-cultured *Taxus chinensis* var. *mairei* under Acid Stress

FAN Huan, SHANG Gui-min, YUAN Ying-jin

(Dept. Parm. Eng., Sch. Chem. Eng. & Technol., Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: The effect of direct current magnetic field (DCMF) on the cell growth and metabolism of suspension-cultured *Taxus chinensis* var. *mairei* under acid stress was examined. The experimental results showed that the ability of cell anti-acid stress, cell viability, biomass and intracellular protein were obviously enhanced by the DCMF. The viability of extracellular PPO was enhanced, and accumulation of phenolics was restrained. Under certain HCl concentration, the higher the concentration of HCl, the stronger the bio-effect of the magnetic field. The obvious change of the medium pH and conductivity indicated that the ability of cell anti-acid stress was enhanced due to accelerated material transmembrane transportation by DCMF.

Key words: direct current magnetic field; *Taxus chinensis* var. *mairei*; acid stress; transmembrane transportation