

外源性多胺及其生物合成抑制剂对 人参愈伤组织生长的作用

钱之玉 刘丹

(药理学教研室)

摘要 人参愈伤组织在分别添加外源性腐胺和精脒及其生物合成抑制剂 *D*-精氨酸的培养基中培养。在 20 天,取愈伤组织测定组织鲜重、内源性多胺水平、DNA、蛋白质含量及生长率。结果表明,随着外源性多胺剂量的增加,内源性多胺的含量升高,DNA 合成增加,可溶性蛋白质和非溶性蛋白质含量显著提高,生长率增高;腐胺和精脒对愈伤组织的作用相似,都促进了其生长。*D*-精氨酸明显地抑制了内源性多胺、DNA 和蛋白质的合成,组织生长受到了抑制,*D*-精氨酸的抑制作用表现出良好的量效关系。结果说明多胺是人参愈伤组织生长必不可少的调节因子。

关键词 人参愈伤组织;腐胺;精脒;*D*-精氨酸;HPLC;脱氧核糖核酸;蛋白质

多胺是生物代谢过程中产生的具有生物活性的低分子脂肪族含氮化合物,广泛存在于原核细胞和真核细胞。在植物、动物和微生物的生长过程中,多胺被认为是重要的生长因子,对生长发育起调节作用或起第二信使的作用。多胺与细胞分裂、细胞分化、细胞膜稳定、核酸和蛋白质的合成及衰老等都有着密切的关系^[1-2]。植物多胺的研究在近二、三十年逐渐地广泛开展。植物细胞主要存在二胺(腐胺,PUT)、三胺(精脒,SPD)及四胺(精胺,SPM),而其它多胺则很少。多胺的化学性质、生物合成代谢途径已有深入研究和了解,植物多胺的某些生理作用已被揭示^[3]。在许多生长活跃的器官和组织,多胺生物合成的速率增高。如分裂活跃的烟草悬浮培养的细胞^[4],*phseolus* 的新生芽和叶,土豆块茎芽的分生组织^[5],正在发育的番茄子房^[6],鳄梨发育早期的果实和烟草根的分生组织等。在薄层烟草组织培养,在细胞分化过程中多胺水平都有提高;多胺含量增高促进了器官发生和胚形成^[7]。总之,多胺在植物生长发育中的作用越来越引起人们的兴趣和重视。

基于人参愈伤组织经多年培养与选择,具有细胞单一、均匀、生长速度快和易于控制等特点,我们选用其为研究多胺作用的实验材料,观察添加外源性多胺及其抑制剂对人参愈伤组织内源性多胺、DNA、蛋白质和组织生长的影响,试图进一步了解多胺的植物生理作用。

1 仪器和材料

1.1 材料 人参愈伤组织[*The Callus of Panax ginseng* (CA, Meyer)]的生产种由本校中药学院植物组织培养研究室提供。腐胺(Putrescine)、精脒(Spermidine)、精胺(Spermine)、1,10-二氨基癸烷(1,10-DiminoDecane)均为 Sigma 产品。丹磺酰氯(DNS-Cl) Fluka 公司产品,瑞士分装;牛血清白蛋白为上海第二医科大学产品;脱氧核糖核酸为上海牛奶公司综合厂产品;酚试剂自制。

1.2 仪器 岛津 6A 高效液相色谱系统(含 RF-536 荧光检测器,Rheodyne 7215 进样阀)日本产品;Nova PaK-C₁₈ 反相柱(3.9 mm × 150 mm, 4 μm)美国 Waters 产品。

收稿日期 1993-04-19

2 方法

2.1 人参愈伤组织的培养

2.1.1 MS培养基的配制 除基本营养物质,另含吡啶乙酸(1.78 mg/L),吡啶丁酸(2.03 mg/L),激动素(0.1 mg/L),蔗糖(20 g/L),琼脂(9 g/L),水解乳蛋白(0.5 g/L)。每瓶加入 40 ml 培养基,高压湿热灭菌。

2.1.2 外源性多胺及其抑制剂的添加 在高压湿热灭菌后尚未冷却的培养基中分别加入一定量的 PUT、SPD 及 D-Arg 溶液,对照加入等量无菌水,摇匀,静置冷凝,待接种。

2.1.3 接种 用生长较平稳旺盛的人参愈伤组织作种,每瓶以 1.0 g 的量接种在配好的培养基中,25±1℃ 恒温黑暗培养。

2.2 测定方法

2.2.1 组织鲜重增长比的测定 培养瓶中所有鲜组织取出,称量。该鲜重与接种量之比即增长比。

2.2.2 多胺的测定 将组织于冰浴中研成匀浆。取该匀浆 2.0 g 加入适量 1.05 mol/L 高氯酸溶液,使高氯酸的最终浓度达到 0.4 mol/L,同时加入 1 mg/ml 的 1,10-二氨基癸烷(内标)30 μl,冰融混匀。9000 r/min 离心 20 min(沉淀留作 DNA 测定),取上清液,调 pH 至中性,取 200 μl,加饱和碳酸钠溶液 150 μl 和 30 mg/ml 丹磺酰氯丙酮溶液 100 μl,混匀,于 60℃ 水浴中反应 30 min,冷却后加乙醚提取三次,合并乙醚提取液,减压干燥。甲醇溶解后即可供测定。色谱条件和标准曲线

采用文献方法^[8]。

2.2.3 DNA 测定 在上述沉淀物中加入 0.1 mol/L 高氯酸 2.5 ml,混匀。沸水浴消化 15 min,冷却,4000 r/min 离心 10 min。取上清液测 DNA^[9]。

2.2.4 蛋白质的测定 取组织匀浆 400 mg,加入 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液(pH6.0) 2.6 ml,冻融混匀,4000 r/min 离心 10 min,上清液用于测定可溶性蛋白质。沉淀中加入 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液 2.0 ml,90℃ 水浴 20 min,冷却,4000 r/min 离心 10 min,上清液用于非溶性蛋白质测定。蛋白质测定采用福林酚试剂法。

3 结果

3.1 外源性腐胺和精脒对人参愈伤组织生长的影响

在培养基中添加一定量的外源性腐胺,使浓度分别为 P₁(1.0 μmol/L),P₂(10.0 μmol/L),P₃(100.0 μmol/L)等 3 组;添加一定量的外源性精脒,使各组浓度分别为 S₁(1.0 μmol/L),S₂(5.0 μmol/L),S₃(10.0 μmol/L),S₄(50.0 μmol/L)等 4 组。于 20 天取接种 1 克所生长的愈伤组织测定总的内源性多胺、DNA、蛋白质含量(可溶性蛋白质 BSP 和非溶性蛋白质 BIP)和测定组织鲜重(GR),以对照组为 100% 求其相对量进行比较。结果表明外源性多胺对上述指标均有明显的作用。见表 1。

Tab 1. Effect of exogenous polyamine on growth of the callus of *Panax ginseng* in each flask. n=5

Treatment Group	Conc., μmol/L	Putrescin		Spermidine		DNA		BSP		BIP	
		μg/flask	Inc. %	μg/flask	Inc. %	μg/flask	Inc. %	mg/flask	Inc. %	mg/flask	Inc. %
control		88.2±9.3		90.4±9.6		572.5±20.3		2.7±0.2		2.3±0.2	
P ₁	1.0	98.8±8.8*	12	90.4±9.9*	0	652.7±31.5*	14	3.5±0.3*	28	2.6±0.1*	3
P ₂	10.0	112.9±10.6**	28	114.8±10.8**	27	732.8±68.7**	28	3.8±0.3***	39	3.1±0.2**	33
P ₃	100.0	210.8±17.6***	139	126.6±11.8***	40	767.2±80.2**	34	4.6±0.2***	71	3.5±0.1***	53
control		86.4±7.1		87.6±6.8		556.3±53.1*		2.8±0.3		2.2±0.1	
S ₁	1.0	96.8±7.8*	12	92.0±7.9*	5	656.1±61.2*	18	3.5±0.3*	24	2.5±0.2*	12
S ₂	5.0	107.0±10.4**	24	103.4±7.0**	18	728.2±78.0**	31	4.0±0.3***	42	2.8±0.2**	29
S ₃	10.0	119.2±8.6**	38	113.0±9.6**	29	801.4±83.1***	44	4.5±0.4***	59	3.4±0.2***	55
S ₄	50.0	127.0±11.2***	47	113.9±12.3**	30	751.9±56.5***	35	4.6±0.4***	64	3.2±0.2***	46

*P>0.05, **P<0.05, ***P<0.01, rs control.

Each experiment was repeated at least thrice. Values are the means and standard deviations of different experiment values.

3.2 多胺生物合成抑制剂 *D*-Arg 对人参愈伤组织生长的影响

培养基添加 *D*-Arg, 使各组浓度分别为: D_1 (0.05 mmol/L), D_2 (0.5 mmol/L), D_3 (2.0 mmol/L), D_4 (3.5 mmol/L), D_5 (5.0 mmol/L)

等 5 组。接种 1 克愈伤组织, 培养 20 天, 分别取其测定总的内源性多胺、DNA、蛋白质及组织鲜重, 结果见表 2。表明多胺生物合成抑制剂 *D*-Arg 竞争性地抑制了上述指标, 并有剂量依赖关系。

Tab 2. The effect of polyamine biosynthesis inhibitor (*D*-Arg) on growth of the callus of *Panax ginseng* in each flask. $n=5$.

Group	Conc., μmol/L	Putrescin		Spermidine		DNA		BSP		BIP	
		μg/flask	Decr. %	μg/flask	Decr. %	μg/flask	Decr. %	mg/flask	Decr. %	mg/flask	Decr. %
control		94.6±3.8		96.8±3.2		554.6±23.7		2.8±0.4		2.4±0.3	
D_1	0.05	68.1±6.6**	28	89.0±2.9**	8	621.2±22.2*	-12	2.7±0.2*	5	2.3±0.2*	6
D_2	0.50	43.5±5.7***	54	88.1±4.8**	9	604.0±49.9*	-9	2.6±0.3*	8	2.3±0.2*	5
D_3	2.00	24.6±2.8***	74	77.4±7.7***	20	521.3±27.7*	6	2.3±0.3**	17	2.1±0.1**	12
D_4	3.50	12.3±0.9***	87	60.0±9.7***	38	438.1±44.4***	21	1.7±0.2***	39	2.0±0.2**	18
D_5	5.00	4.0±0.5***	96	17.4±6.8***	82	305.0±61.0***	45	0.6±0.1***	77	1.3±0.3***	44

* $P>0.05$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$, w control.

Each experiment was repeated at least thrice. Values are the means and standard deviations of different experiment values.

4 讨论

表 1 表明适当浓度的外源腐胺和精脞明显地增加内源性多胺的含量, 提高的内源性多胺又明显地促进人参愈伤组织蛋白质合成, 使可溶性蛋白质和不溶性蛋白质含量增高, 组织鲜重增加, 并表现出较好的量效关系。文献报道, 在一些原核细胞和真核细胞增殖过程, 多胺合成的加速与核酸和蛋白质合成的加速关联, 一般来说, 细胞分裂最旺盛部分, 多胺生物合成也最活跃。Galston 等人用添加外源性多胺的方法, 激发了一般不进行分裂的培养的燕麦叶原生质体的 DNA 合成和有丝分裂活性^[10]。在无细胞系统加入多胺能够促进蛋白质的合成^[10]。在麦子的胚芽, 精脞通过加快多胺链的启动和延长提高多肽的合成^[11]; 在休眠体组织添加外源性多胺能促进其蛋白质的合成。上述的研究结果与本实验结果是相似的。我们亦发现, 多胺促进人参愈伤组织的生长存在最适剂量范围, 这与 Smith 在其综述中指出, 多胺在 10~100 μmol/L 浓度范围内能够对一些植物的休眠体和组织培养物有显著的生长作用, 高浓度时可能无效或甚至产生毒性作用相一致。

D-Arg 是 *L*-Arg 的同分异构体, 是 ADC

的竞争性抑制剂^[12], 从而抑制腐胺, 进而抑制精脞的生物合成。我们发现 DFMO 对人参愈伤组织生长影响甚微, 因此认为人参愈伤组织主要通过 ADC 途径合成多胺, *D*-Arg 能够通过抑制内源性腐胺和精脞的合成, 使愈伤组织的生长包括 DNA 和蛋白质的生物合成及其生长受到明显的抑制。

致谢 丁家宜老师对本实验工作给予了大力支持。

参考文献

- 1 Slocum RD, Kaur-Sawbrey R and Galston AW. The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch Biochem Biophys*, 1984; **253**:283
- 2 Smith TA. Polyamines. *Annu Rev Plant Physiol*, 1985; **36**: 117
- 3 Galston AW, Kaur-Sawbrey R. Polyamines: are they a new class of plant growth regulators; In: Wareing PF. *Plant Growth Substance*, New York: Academic Press, 1982; 451-62
- 4 Palavam N, Galston AW. Polyamine biosynthesis and titer during varous developmental stages of *Phascolus vulvaris*. *Plant Physiol*, 1982; **55**:437
- 5 Kaur-Sawbrey R, Shih LM, Galstone AW. Relation of polyamine biosynthesis to the initiation of sprouting in potato tubers. *Plant Physiol*, 1982; **69**:411
- 6 Cohen E, Arad S, Heimer YM, et al. Participatin of ornithine decarboxylase in early stages of tomato fruit devepolment. *Plant Physiol*, 1982; **70**:540
- 7 Tiburcio AF, Kaur-Sawbrey R, Galston AW. The effect of polyaminesbiosynthesis inhibitors on alkaloids and organogenesis in tobacco callus cultures. *Plant Cell Culture*, 1987; **9**:111

- 8 钱之玉,倪坤仪,刘京丽. 生物组织和细胞中多胺的高效液相色谱测定. 中国药科大学学报, 1988, 10(3): 187
- 9 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生物化学实验方法和技术. 北京:高等教育出版社, 1981: 29
- 10 Tabor CW. 1, 4-Diaminobutane (Putrescine), Spermidine and Spermine. *Annus Rev Biochem*, 1976, 45: 285
- 11 Tabkamoto T, Nagamaetsu Y. The study of Spermidine stimulated polypeptide synthesis in cell-free translation of mRNA from lactating mouse mammary gland. *Biochem Biophys Acta*, 1983, 740: 73
- 12 沈惠娟. 多胺生物合成抑制剂对蕃茄幼苗根长和小米种子发芽的影响. 植物生理通讯, 1990, (1): 20

Effect of Exogenous Polyamines and Its Biosynthesis Inhibitor (*D*-Arg) on Growth of the Callus of *Panax Ginseng*

Qian Zhiyu, Liu Dan

Department of Pharmacology

The callus of *Panax ginseng* was cultured on MS medium added putrescine (PUT), spermidine (SPD) and *D*-arginine (*D*-Arg) respectively, at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in the dark, the changes of endogenous polyamine, DNA, protein and fresh weight of the callus were assayed at day 20. Shimadzu 6A HPLC with a NOVA Pak-C₁₈ column and a fluorescence detector, Disphenylamine method and Lowry method were used to determine polyamine, DNA and protein, respectively. The results showed that endogenous PUT and SPD were increased, DNA biosynthesis was enhanced, the content of soluble and insoluble proteins was raised; at the same time, the growth of the callus was promoted. Exogenous PUT and SPD have the same effects on the callus of *Panax ginseng* and a fine dose-effect correlation. *D*-Arg inhibited the callus endogenous PUT and SPD, DNA as well as protein biosynthesis. The inhibition showed a dose-dependence. All above results suggest that the polyamines are a kind of essential growth regulators to the callus of *Panax ginseng*.

Key words The callus of *Panax ginseng*; Polyamine; Putrescine; Spermidine; DNA; Protein; *D*-Arginine

【文摘 020】贝凡洛尔在兔的血药浓度与心率的关系(英文) 柳晓泉,叶晓儒,朱好勤,黄圣凯. 中国药理学报, 1993, 14(3): 200-2

用药物动力学-药效学结合模型(PK-PD),对兔贝凡洛尔血药浓度与心率的关系作定量分析,兔iv贝凡洛尔后,其心率变化明显滞后于血药浓度的变化,用PK-PD模型估算了其效应动力学参数 K_{00} 和 EC_{50} ,兔iv 5, 10 mg/kg后, K_{00} 分别为 0.03 ± 0.02 , $0.029 \pm 0.009 \text{ min}^{-1}$, EC_{50} 分别为 0.2 ± 0.1 , $0.27 \pm 0.14 \mu\text{g/ml}$.

【文摘 021】环磷酸胺对缺血后心、脑、肾中的核苷酸耗竭的保护作用 朱远,范远泽,戴德哉. 中国药理学报, 1993, 14(3): 285-8

大鼠断头,使心、脑及肾缺血10 min,以反相HPLC紫外检测ATP、ADP及AMP。环磷酸胺 po 20及10 mg/kg × 3d,使循环血中白细胞数显著减少,明显减轻心、脑、肾中ATP及高能磷酸化合物总量的缺血性排空。故推测环磷酸胺抗心律失常的机制可能是减轻了粒细胞在心肌毛细血管的堵塞效应,使因ATP耗竭而开放的ATP依赖的K⁺通道阻断。