

模拟失重对钙调蛋白基因表达 与人参皂苷合成的影响*

胡向阳 方建颖 蔡伟明** 汤章城

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032

摘要 在利用回转器模拟失重的生物学效应试验中对人参细胞的钙调蛋白(CaM)基因表达与人参皂苷合成展开研究. 结果显示回转处理不仅在初始阶段可以诱导 CaM 基因表达的提高, 而且在处理人参细胞的 18 h 之内, CaM 基因表达还呈现波动性变化. 说明了 Ca^{2+} 依赖信号转导系统在转导重力变化刺激信号过程中的复杂性. 回转处理还可以诱导人参皂苷的合成与人参皂苷合成相关基因鲨烯合酶基因(squalene synthase gene, *sqs*)与鲨烯环氧酶基因(squalene epoxidase gene, *sqe*)的表达. Ca^{2+} 螯合剂 EGTA、质膜钙通道抑制剂 $LaCl_3$ 与细胞内膜钙通道抑制剂钌红(ruthenium red, RR)都可以抑制回转诱导的 CaM 基因、*sqs* 与 *sqe* 的表达, 以及提高人参皂苷的合成. 这种相关性说明胞外 Ca^{2+} 的内流与胞内钙库的 Ca^{2+} 向外流入胞质中, 对于回转诱导人参细胞内皂苷含量的升高都是必须的, CaM 可能介导了回转诱导人参皂苷合成的模拟失重效应. CaM 拮抗剂氯丙嗪(CPZ)与 N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W_7)可以抑制回转诱导的人参皂苷合成, *sqs* 与 *sqe* 的表达也显示了 CaM 的介导作用.

关键词 模拟失重 人参 皂苷 钙调蛋白

随着科学技术的发展, 开发与利用地球外太空的时代已经到来. 太空与地面的显著差别之一就是微重力环境. 人类要实现从地球走向太空就必须认识微重力环境对生物体的影响^[1,2]. 过去几十年的研究表明: 微重力环境可以在个体、器官、组织、细胞、亚细胞与基因等各级水平上影响生物体^[1]. 比如微重力环境可以影响植物细胞的有丝分裂、胞质分裂、组织分化、根冠再生等^[1,3]. 近几年 NASA 的空间飞行实验显示: 在微重力环境中, 某些植物木质素合成水平下降, 并导致植物次生代谢途径的走向发生变化, 从而使一些有重要药用价值的植物次生代谢物质合成水平提高^[4~6]. 这些结果不仅增强了人们对太空植物生理过程的认识, 也为开发与利用太空资源提供了新的思路.

为了克服空间搭载机会少的限制, 各国科学家还利用回转器、自落机、高空抛物线飞行器、落塔等设备进行模拟失重效应的实验与开展微重力效应

的研究^[3,4].

CaM 与胞内 Ca^{2+} 在植物响应重力刺激过程中起到十分重要的作用^[7], 但是绝大多数工作都是在细胞与亚细胞水平上进行的, 目前尚没有从基因水平研究 Ca^{2+} 在参与植物响应微重力环境过程中的作用的报告.

人参是我国及东南亚地区的一种传统药材, 具有驱病强身, 抗肿瘤, 抗衰老等功效^[8~10]. 人参皂苷作为一种次生代谢产物, 是人参中重要的活性成分. 提高人参皂苷的含量具有重要的商业价值. 鲨烯是合成人参皂苷的一种重要前体物质, 鲨烯合酶(squalene synthase)与鲨烯环氧酶(squalene epoxidase)是鲨烯合成与鲨烯向皂苷转变过程中的关键酶^[8]. 我们在利用回转器处理人参愈伤组织细胞来模拟失重生物学效应时发现人参皂苷的含量提高, 人参细胞中 CaM 基因的表达也被诱导, 并且这种表达呈现波动性变化. 本文将就此作一报告, 并进

2002-11-07 收稿, 2003-03-17 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 39770199)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-SW-322)资助

** 联系人, E-mail: wmc@iris.sipp.ac.cn

一步论述在模拟失重效应试验中质膜及细胞内膜上的钙通道与 CaM 在介导提高人参皂苷合成中的作用.

1 材料与方 法

1.1 人参细胞

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)愈伤组织细胞培养在 0.8% 琼脂固化的 67-V 培养基上^[10], 在培养基中附加 1.5 mg/L 2, 4-D, 0.1 mg/L 萘乙酸, 1 mg/L 吲哚乙酸, 0.25 mg/L 激动素. 在 25℃ 中暗培养. 每 30 d 转接一次, 实验时取转接 3 d 后的愈伤组织为材料.

1.2 模拟失重效应与抑制剂处理

按 Silver 的方法^[11]用 2 r/min 的 1 π 回转器(上海植物生理研究所研制)进行模拟失重效应试验. 将接种有人参细胞的三角瓶固定于回转器的回转圆套中, 回转器置于 25℃ 温室并在黑暗条件下回转^[10]. 取出回转处理过不同时间的人参细胞用液氮迅速冷冻, 进而分析总皂苷与提取 RNA. 抑制剂处理试验中, 将不同浓度的抑制剂用微孔滤膜过滤灭菌以后, 处理培养了 3 d 的人参愈伤组织, 用回转器处理, 在不同时间内取出进行分析.

1.3 皂苷含量的分析

将回转处理不同时间的人参愈伤组织细胞取出, 用无水乙醇充分研磨成匀浆状, 再加入等体积的正丁醇, 充分振荡以后置于室温下过夜分层, 取上层正丁醇相. 将下层乙醇相用正丁醇再重复萃取两次以后, 合并正丁醇相. 将合并的正丁醇相在 60℃ 下减压蒸干, 再用 3 mL 左右乙醇充分洗涤后得到人参总皂苷. 人参皂苷的测定按文献^[12]方法进行. 用人参二醇作标准样品.

1.4 RNA 提取与 Northern 杂交

人参细胞总 RNA 的提取按文献^[13]方法进行. RNA 的逆转录与 PCR 按试剂盒(mRNA selective PCR Kit Ver1.1, Takara 公司)方法进行. *sqs* cDNA 的扩增引物为 5'—AGGTTGATGTGCCTGGAC—3' 和 5'—CGGGCTTACGAAGGGTGT—3'. PCR 条件为 94℃ 5 min 变性; 94℃ 1 min, 56℃ 50 s, 75℃ 1 min, 30 个循环; 75℃ 延伸 5 min. *sqs* cDNA 的扩增引物为 5'—GCCTTCTGTTACTCTATGC—3' 和 5'—TTTATTGTCTCCACCTCC—3'. PCR 条

件为 94℃ 5 min 变性; 94℃ 1 min, 52℃ 50 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min. 扩增的 PCR 产物经纯化后按 Dig Kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany)推荐方法进行地高辛标记. 30 μg 不同处理的人参悬浮细胞的总 RNA 经变性电泳以后采用毛细管法转入到尼龙膜上, 在预杂交液(10 × Denhardt 溶液, 3 × SSC, 10% 硫酸葡聚糖, 7% SDS, 167 μg/mL 鲑鱼精 DNA)中 56℃ 预杂交 2 h 后, 加入标记的探针在 56℃ 进行杂交 24~36 h. 杂交条带的检测按试剂盒 (Roche Diagnostics GmbH, Germany)推荐方法进行. 所用 CaM 探针与 18S (S 是沉降系数的单位) rRNA 探针来源于拟南芥种源库(ABRC; Columbus, OH, USA).

2 结果

2.1 模拟失重对人参细胞 CaM 基因转录的影响

Northern 杂交的结果表明: 回转处理人参细胞 3 h 后就可以诱导 CaM 基因转录强度的提高, 然后 CaM 基因的转录在回转处理 6 h 与 9 h 时明显下降, 在 12 h 时反弹, 并且高于在 3 h 时的转录水平. 总之在回转处理 18 h 之内, CaM 基因的转录水平呈现波动性变化, 在 3 h 时转录出现第一个峰, 在 12 h 时出现第二个峰(图 1). 胞外 Ca²⁺ 的螯合剂 EGTA、质膜钙通道抑制剂 LaCl₃ 与胞内钙通道抑制剂 RR 都可以抑制回转处理诱导 CaM 基因转录水平的提高. CaM 的拮抗剂 CPZ 与 W₇ 也可以抑制回转处理诱导 CaM 基因转录水平的提高(图 2).

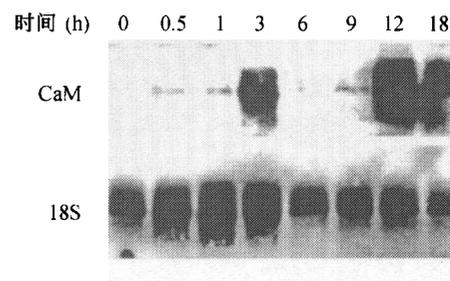


图 1 回转处理诱导 CaM 基因的波动性转录

2.2 模拟失重对人参细胞内皂苷含量的影响

回转处理人参细胞 10 d 以后, 人参细胞内皂苷含量显著升高, EGTA, LaCl₃, RR, CPZ, W₇ 都可以抑制回转处理所诱导的人参皂苷含量的升高(图 3).

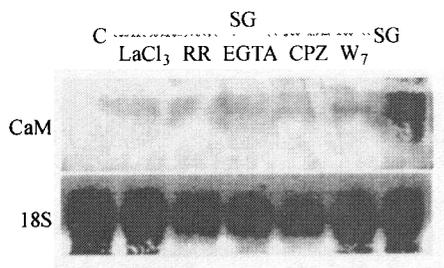


图2 不同抑制剂与拮抗剂对回转12h处理诱导CaM基因转录的影响

C, 对照; SG, 回转处理 (EGTA 10 mmol/L; LaCl₃ 10 μmol/L; RR 10 μmol/L; CPZ 10 μmol/L; W₇ 10 μmol/L)

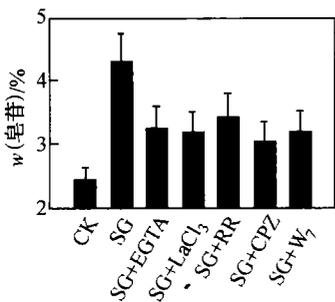


图3 回转、不同抑制剂与拮抗剂处理10d对人参皂苷合成的影响

CK, 对照; SG, 回转处理; 皂苷含量以占人参细胞干重的%计 (EGTA 10 mmol/L; LaCl₃ 10 μmol/L; RR 10 μmol/L; CPZ 10 μmol/L; W₇ 10 μmol/L)

2.3 不同抑制剂对人参细胞内皂苷合成关键酶基因转录的影响

回转处理可以诱导提高人参细胞内 *sqs* 与 *sqe* 的转录水平. 图4显示了回转处理24h后, *sqs* 与 *sqe* 转录水平的提高, EGTA, LaCl₃, RR, CPZ, W₇ 处理可以抑制回转处理所诱导提高的 *sqs* 与 *sqe* 转录水平.

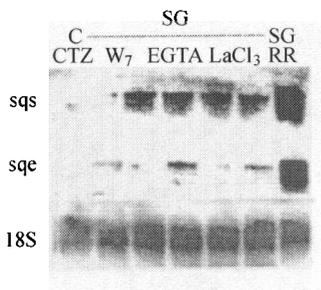


图4 不同抑制剂与拮抗剂处理对回转24h诱导 *sqs* 与 *sqe* 基因转录的影响

C, 对照; SG, 回转处理 (EGTA 10 mmol/L; LaCl₃ 10 μmol/L; RR 10 μmol/L; CPZ 10 μmol/L; W₇ 10 μmol/L)

3 讨论

重力植物生理学研究表明, 植物在感受和转导外界重力变化刺激过程中, 胞内 Ca²⁺ 起到十分重要的作用. 植物在感受外界重力变化信号以后, 局部细胞质 Ca²⁺ 水平的提高可能会影响钙通道和钙泵, 从而影响建立横跨被刺激器官的 Ca²⁺ 的浓度梯度^[2,14]. 乌克兰科学家在豌豆 (*Pisum sativum*) 与三叶草 (*Trifolium repens*) 实验中发现, 失重环境可以导致根尖细胞中 Ca²⁺ 的重新分布, 根冠细胞的细胞质中 Ca²⁺ 水平也有所提高, 而钙通道抑制剂可以抑制失重引起的这种细胞 Ca²⁺ 水平的变化^[2,15]. CaM 通过结合胞内 Ca²⁺, 在植物感受重力变化刺激过程中起着十分重要的作用^[7,16,17].

我们的实验结果不仅显示了在模拟失重效应试验中利用回转处理可以诱导人参细胞内 CaM 基因的转录, 而且这种转录的水平在回转处理的18h内呈现一种波动性变化. 钙通道抑制剂可以抑制回转处理引起的 CaM 基因表达的提高. 因此, CaM 基因表达的波动性变化, 可能也是和在回转处理过程中诱导人参细胞胞内 Ca²⁺ 浓度波动性变化相关的. 由于植物细胞要准确地感受并传递外界包括重力刺激的各种信号, 通过胞内 Ca²⁺ 浓度的简单变化是不够的, 胞内 Ca²⁺ 的浓度往往表现为一种振荡性或波动性变化, 这种变化还有严格的时间顺序, 空间间隔与限制, 同时这种变化往往与其他信号分子共同作用, 才能引起生物体对外界刺激的反应^[16].

太空微重力环境可以抑制某些植物细胞木质素的合成, 提高一些有生物活性的植物次生代谢产物的含量^[3,10]. 因为在植物次生代谢途径中, 木质素与很多有重要药用价值的代谢物在合成过程中都需要共用相同的前体. 在太空微重力环境中有些植物的木质素合成受到抑制, 会导致木质素合成前体物质的积累, 从而有利于某些其他有生物活性的次生代谢物质的合成, 促使其产量的提高^[3,6,7]. 在我们的模拟失重效应试验中, 人参细胞内的皂苷含量提高, 皂苷合成关键酶基因 *sqs* 与 *sqe* 的转录水平也被诱导提高. 这些结果也反映出利用太空微重力环境改变植物次生代谢途径的方向, 提高有用次生代谢产物含量的可能性.

在模拟失重效应试验中, 钙道通抑制剂和 CaM 拮抗剂抑制 *sqs* 与 *sqe* 的转录, 皂苷含量提高说明, 在回转处理诱导人参皂苷合成过程中, CaM 可能起

了介导作用；胞内 Ca^{2+} 浓度的升高可能作为第二信使促使诱导 *sqs* 与 *sqe* 的转录增加。胞外 Ca^{2+} 的内流与胞内钙库的 Ca^{2+} 向外流入胞质中，对于回转诱导人参细胞内皂苷的升高都是必须的，因为质膜钙通道抑制剂与内质网膜等细胞内膜钙通道抑制剂的预处理都可以抑制回转诱导人参细胞的皂苷含量的升高。在我们的实验中，CaM 拮抗剂还可以抑制 CaM 基因的转录水平。因此 CaM 拮抗剂不仅可以抑制 CaM 活性，而且还能抑制 CaM 基因的转录而抑制 CaM 的合成，从而抑制模拟失重诱导的 *sqs* 与 *sqe* 转录，以及人参皂苷的合成。然而，CaM 拮抗剂抑制 CaM 基因转录的机制还待进一步研究。钙通道抑制剂和 CaM 拮抗剂对模拟失重诱导 *sqs* 与 *sqe* 转录与人参皂苷合成的抑制作用不是完全的，暗示可能还有其他信号分子参与了模拟失重诱导 *sqs* 与 *sqe* 的转录与人参皂苷合成，已有报道 H_2O_2 ，乙烯等小分子物质也参与了植物对失重与模拟失重的响应过程^[18,19]。

参 考 文 献

- Halstead T W, et al. Plant in space. *Annu Rev Plant Physiol*, 1987, 38: 317
- 刘存德. 空间环境对植物的效应. 江丕栋主编. 空间生物学. 青岛: 青岛出版社, 2000. 21~62
- 蔡伟明, 等. 空间微重力环境(模拟环境)对生物系统的效应. 姜景山主编, 空间科学与应用. 北京: 科学出版社, 2001. 535~550
- 费翅鲲, 等. 模拟微重力的植物生物学效应. 自然科学进展, 2002, 12(2): 135
- Campbell J, et al. Prevalence and arrangement of lignified vascular elements in 6-day-old alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings raised in reduced gravity. *J Plant Physiol*, 1996, 149: 539
- Cowles J, et al. Seedlings growth and development on the space shuttle. *Adv Space Res*, 1994, 14(11): 3
- Sinclair W, et al. The role of calmodulin in the gravitropic responses on the *Arabidopsis thaliana* agr-3 mutant. *Planta*, 1996, 199: 343
- Wu J Y, et al. Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: Current technological and applied aspects. *Journal of Biotechnology*, 1999, 68: 89
- Osborn A, et al. Saponin detoxification by phytopathogenic fungi. In: Stacey G et al. eds. *Plant-Microbe Interactions*. Volume 2. New York: International Thomson Publishing, 1997. 99~124
- 赵 炜, 等. 模拟微重力环境因子对人参细胞生长与人参皂苷含量的影响. 植物生理学报, 1998, 24: 159
- Silver I L. The dynamics of a discrete geotropic sensor subject to rotation-induced gravity compensation. *J Theoret Biol*, 1976, 61: 353
- Zhong J J, et al. Effects of nitrogen source on the production of ginseng saponin and polysaccharide by cell culture of *Panax quinquefolium*. *Process Biochemistry*, 1998, 33: 671
- Levine A, et al. H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 1994, 79: 583
- Hilaire E, et al. Microgravity and clinorotation cause redistribution of free calcium in sweet clover *Columella* cells. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36: 831
- Evans M L, et al. The role of calcium in the response of roots to auxin and gravity. In: Pharis R, et al. eds. *Plant Growth Substances*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. 209~215
- Sinclair W, et al. Calcium in gravitropism: A reexamination. *Planta*, 1997, S85
- Fasano J M, et al. Ionic signaling in plant responses to gravity and touch. *J Plant Growth Regulation*, 2002, 21: 71
- Madlung A, et al. Ethylene plays multiple nonprimary roles in modulating the gravitropic response in tomato. *Plant Physiol*, 1999, 120: 897
- Joo J H, et al. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1055