维普资讯 http://www.cqvip.com

云 南 植 物 研 究 2004, 26 (5): 543~548
Acta Botanica Yunnanica

水杨酸诱导美登木悬浮细胞产生脂氧合酶及多羟基脂肪酸的研究*

李 靖, 赵沛基, 鲁春华, 刘小烛, 曾 英, 沈月毛**
(中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要: 水杨酸 (SA) 可诱导云南美登木 (*Maytenus hookeri*) 悬浮培养细胞产生 9-脂氧合酶 (9-lipoxygenase, 9-LOX)。通过 LC-ESI-MS 测定 SA 诱导下悬浮培养系中多羟基脂肪酸的含量变化, 发现用浓度为 800 μmol/L 的 SA 诱导培养 18 h, 悬浮细胞产生最大量的三羟基十八碳烯酸。同时, 通过对比不同羟基十八碳烯酸含量的变化, 推测在 SA 诱导下, 9-LOX 介导的十八碳酸途径中有环氧中间体的生成。

关键词: 云南美登木; 水杨酸; 脂氧合酶; 多羟基脂肪酸; 十八碳酸途径
中图分类号: Q 945, Q 946 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2700(2004)05-0543-06

Studies on Lipoxygenase and Polyhydroxy Fatty Acid in SA-elicited *Maytenus hookeri* Suspension Cells

LI Jing, ZHAO Pei-Ji, LU Chun-Hua, LIU Xiao-Zhu,
ZENG Ying, SHEN Yue-Mao**
(*Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China)

Abstract: The production of 9-LOX (9-lipoxygenase) was induced by salicylic acid (SA) in the suspension cell cultures of *Maytenus hookeri*. Through LC-ESI-MS studies on content variation of polyhydroxy fatty acid induced by SA, we found that suspension cells accumulated maximum trihydroxy octadecenoic acid after being treated with 800 μmol/L SA for 18 hours. At the same time, by comparing the content variation of different hydroxy octadecenoic acid, we speculated that the octadecanoic acid pathway mediated by 9-LOX included the production of epoxy intermediate.

Key words: *Maytenus hookeri*; Salicylic acid; Lipoxygenase; Polyhydroxy fatty acid; Octadecanoic acid pathway

脂氧合酶 (LOX, EC 1.13.11.12) 是广泛存在于需氧生物中的双加氧酶, 它催化含间亚甲基多烯脂肪酸的氧化, 生成不饱和脂肪酸的过氧化物 (Alexander, 1998)。植物脂氧合酶的主要底物是亚油酸和亚麻酸 (Siedow, 1991), 根据其对亚油酸加氧的位置特异性,

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30070007)
** 通讯作者: To whom correspondence should be addressed. E-mail: yshen@public.km.yn.cn
收稿日期: 2004-02-23, 2004-04-30 接受发表
作者简介: 李靖 (1978-) 女, 硕士, 主要从事植物次生代谢研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

将植物脂氧合酶分为两类：在亚油酸C-9位加氧的被称为9-脂氧合酶，氧原子加在C-13位的称为13-脂氧合酶（Brash，1999）。脂氧合酶作用于亚油酸和亚麻酸产生的脂肪酸过氧化物，在至少7种酶的作用下转化成不同的化合物统称为氧脂（oxylipins），它们在植物的生长发育过程中以及在植物对环境胁迫反应中起着重要的作用（Helena & Mario，2002）。从脂肪酸过氧化物生成氧脂的过程一般都称之谓十八碳酸途径。不同的植物组织有其特异的十八碳酸代谢途径，主要由两方面决定：（1）存在于植物组织中脂氧合酶的位置特异性；（2）可用于过氧化物代谢的酶（Alexander，1998）。

水杨酸（SA）作为重要的信号分子，可激活防御基因的表达，在植物系统获得性抗性（SAR）的建立中起着重要的作用（Yang等，1997；Maleck & Dietrich，1999）。同时，SA也参与调节氧脂的形成（Heiko等，1999）。在大麦叶中，SA可诱导13-LOX基因的表达（Hause等，1999；Vörös等，1998），同时在代谢产物中发现了13-羟基-9，11，15-十八碳三烯酸的积累，推测LOX作用初产物的进一步代谢沿着还原酶途径进行（Heiko等，1999）。

先前，我们从乳突果（*Adelostemma gracillimum*）愈伤组织中分离了两个三羟基十八碳烯酸，经分析MS和NMR光谱数据分别鉴定为9，12，13-三羟基-10-十八碳烯酸和9，10，11-三羟基-12-十八碳烯酸。它们具有相同的分子式和分子量（m/z 330），而在LC-MS实验中准分子离子峰 m/z 353 $[M+Na]^+$ 的保留时间分别为7 min和10 min（赵沛基等，2003）。从结构推断它们均为9-LOX作用于亚油酸的产物。

本文在云南美登木悬浮细胞培养系中，用SA诱导产生的三羟基脂肪酸，LC-MS分析其准分子离子峰为 m/z 353 $[M+Na]^+$，保留时间与9，12，13－三羟基-10-十八碳烯酸的一致，经分离鉴定为9，12，13-三羟基-10-十八碳烯酸。在进行该培养系所产生的多羟基脂肪酸的LC-ESI-MS检测时，以此化合物作为标准样品。本实验结果不仅为该物种中脂氧合酶基因及酶蛋白的分离奠定了基础，同时，也为研究SA诱导下的十八碳酸的次级代谢提供了新的信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为已连续继代40代以上的云南美登木（*Maytenus hookeri*）愈伤组织无性系。继代培养30 d左右转代一次。愈伤组织的基本培养基为添加BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L的MS培养基，细胞悬浮培养的基本培养基为添加NAA 2.0 mg/L + KIN 0.1 mg/L的MS培养基，培养基的pH值均为5.8。

选择生长较好的培养30 d的愈伤组织接种到悬浮培养液中，进行摇床培养。每100 ml三角瓶分装20 ml的培养液，每三角瓶的接种量约为2.0 g（鲜重）细胞，摇床转速120 r/min，25±2℃下于黑暗中培养。接种两周的悬浮培养细胞用于SA诱导实验。

1.2 水杨酸诱导

将SA（分析纯）溶解于无水乙醇中，配成1 mol/L母液。分别加入培养液中，至终浓度分别为50，100，200，400和800 μmol/L。同时设有两个对照实验，对照1：加入无水乙醇至终浓度为800 μmol/L，对照2：空白对照，即正常培养系。诱导培养4 d后，分别收集悬浮细胞和培养液，用于多羟基脂肪酸含量的测定。

确定最佳SA浓度后，在该浓度下进行诱导，间隔6 h取样（分别为加入水杨酸后0，6，12，18，24，30和36 h），同样收集悬浮细胞和培养液，分别用于多羟基脂肪酸含量的测定。每组实验均设有3个平行。

1.3 多羟基脂肪酸含量测定

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3.1 样品的提取　收集的细胞（3个平行合并，约0.5 g/干重）用100 ml丙酮提取3次，合并提取液，蒸干，用3 ml甲醇溶解，经0.25 μm滤纸过滤后用作LC-ESI-MS检测。培养液（40 ml）用40 ml乙酸乙酯萃取3次，处理过程同前。

1.3.2 LC-ESI-MS检测（牛长群和祝仕清，2001）　样品经过反相HPLC系统（HPLC Waters 2695，C_{18}反相柱3.5 μm，3.0×50 mm），流动相A为甲醇、B为含1%甲酸的蒸馏水梯度洗脱，进样量为10 μl，流速为0.2 ml/min。用Thermo Finnigan LCQ Advantage质谱仪进行ESI-MS（离子阱）分析，质谱仪参数设置分别为：Capillary Temp（270℃），Sheath Gas Flow（15 psi），Source Current（80 μA），Capillary voltage（20 V）。流动相前20 min为甲醇:水（63:37），25～30 min为甲醇。在以上实验条件下，以9，12，13-三羟基-10-十八碳烯酸（MW:330）作为标准品进行质谱检测，保留时间为7 min，质谱检测的准分子离子峰为 m/z 353 $[M+Na]^+$。

1.4 脂氧合酶活性初测（Cornelia等，2002）

取5 g悬浮细胞（经800 μmol/L水杨酸诱导6 h），液氮条件下研磨成粉末，向其中加入10 ml 4℃预冷的100 mmol/L磷酸钾缓冲液（pH 6.0），4℃搅拌提取30 min。10 000×g冷冻离心10 min，收集上清，加入反应底物（杂脂肪酸甘油酯，含20%油酸，43%的亚油酸，21%的亚麻酸）至亚油酸终浓度为120 μmol/L，室温放置30 min。反应产物用3倍体积的氯仿/甲醇混合物（2:1，v/v）提取3次，提取液合并后，12 000×g冷冻离心10 min，收集有机相，用压缩氮气吹干，溶解于1 ml色谱纯甲醇中，用作LC-ESI-MS检测。

2 实验结果

2.1 不同的水杨酸浓度下多羟基脂肪酸含量的变化

LC-ESI-MS检测结果表明当水杨酸浓度为800 μmol/L时，在培养液提取物和细胞提取物中都检测到了准分子离子峰 m/z 353的存在，而在其他诱导条件和对照中，均无此峰存在。细胞提取物中 m/z 353的离子强度为3.8 E6，培养液提取物中 m/z 353的离子强度为3.4 E6，保留时间为6.4～7.4 min。因此可初步得出以下结论：当向悬浮细胞中加入800 μmol/L的SA，诱导培养4 d后，细胞内合成了9，12，13-三羟基-10-十八碳烯酸，并且部分产物由胞内分泌到培养液。因此，在以下实验中，以800 μmol/L的SA进行诱导。

2.2 多羟基脂肪酸含量随时间的变化

向平行培养的21瓶悬浮细胞中分别加入800 μmol/L的SA，间隔6 h取样，过滤分离细胞和培养液，分别提取后进行LC-ESI-MS检测。细胞提取物的检测结果显示：在 m/z 319处出现明显的离子峰，保留时间为25.3～25.8 min。培养液提取物的检测结果显示：在 m/z 335和353处出现明显的离子峰，保留时间分别为22.3～23.1 min和6.4～7.4 min。实验数据见表1。

表1　SA（800 μmol/L）诱导云南美登木悬浮培养细胞，不同诱导时间氧脂含量变化*

Table 1　The concentrations of oxylipins in the extracts of the cells and broth of suspension cell cultures of *Maytenus hookeri* elicited with SA (800 μmol/L)

编号	平均接种量/g	诱导时间/h	m/z 319（cells）	m/z 335（broth）	m/z 353（broth）
T0	2.8	0	1.4E7	–	–
T1	2.8	6	2.2E7	–	–
T2	2.9	12	1.5E7	2.9E5	8.7E5
T3	2.7	18	1.3E7	8.1E5	1.8E6
T4	2.8	24	2.5E7	1.2E5	1.4E6
T5	2.8	30	2.1E7	1.5E5	1.0E6
T6	2.6	36	1.2E7	1.1E5	6.2E5

*以准分子离子峰的强度表示氧脂的含量，不同化合物的准分子离子峰强度之间没有可比性。

维普资讯 http://www.cqvip.com

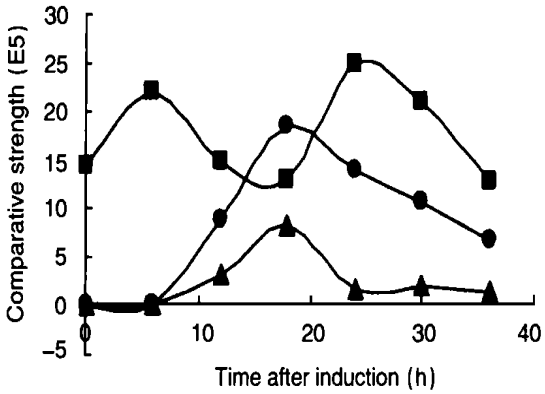

图1 氧脂含量随时间变化曲线

Fig. 1 Time course of the comparative strength of oxylipins m/z 353, 335 and 319

● m/z 353; ▲ m/z 335; ■ m/z 319

(■所代表的数值均缩小为1/10)

不同诱导时间下3个氧脂准分子离子峰的变化趋势如图1所示，m/z 335和353峰的变化趋势一致，都是先升高再降低，且在诱导18 h后达到最大值，但是m/z 335峰处于353峰之下。m/z 319峰先升高再降低，在诱导18 h后处于较低点，随后又升高再降低。

2.3 脂氧合酶活性的测定

取经800 μmol/L水杨酸诱导6 h的悬浮细胞进行粗酶活性的鉴定，实验结果如表2所示。底物的准分子离子峰为m/z 900，9，12，13-三羟基-10-十八碳烯酸的准分子离子峰为m/z 353。

由表2可以看出：对照反应中没有检测到9，12，13-三羟基-10-十八碳烯酸产物；将底物溶解于终浓度为1%的无水乙醇中，进行酶反应，检测到了三羟基十八碳烯酸的存在，同时在m/z 319和m/z 335处出现相应的离子峰，可见确实存在底物到产物的转化，说明该条件诱导产生了9-LOX，并且在酶粗提液中存在着有活性的酶蛋白。该实验重复两次，得到一致的实验结果。

表2 酶活性测定数据

Table 2 Data of enzyme reaction

实验组*	m/z 900	m/z 319	m/z 335	m/z 353
E	-	-	-	-
B	-	-	-	-
E+B	-	-	-	-
E+ET	-	-	-	-
B+S1	1.5E6	-	-	-
E+S1	1.3E6	1.7E5	8.4E4	2.5E5

* E-酶粗提液；B-缓冲液；ET-无水乙醇；S1-溶于无水乙醇的底物

3 讨论

本文探讨了在SA诱导下，美登木悬浮培养细胞中LOX的产生及其产物的进一步代谢，从以上实验结果可以看出，SA可诱导悬浮细胞产生9-LOX，并且在代谢产物中有9，12，13-三羟基-10-十八碳烯酸的积累，它是亚油酸的衍生物。同时在代谢产物中检测到m/z 319 $[M+Na]^+$和m/z 335 $[M+Na]^+$处有明显的准分子离子峰，根据它们的分子量、保留时间以及诱导产生的LOX类型和终产物的结构，推断这两个化合物的结构分别为9-羟基-10，12-十八碳二烯酸和9-羟基-12，13-环氧-10-十八碳烯酸（图2）。根据图1显示的三者的含量变化，推断这两个化合物为9，12，13-三羟基-10-十八碳烯酸的前体，因为当m/z 319峰降低时，m/z 335和353峰升高，说明有m/z 319到m/z 335和353的转化，同时，m/z 335和353变化趋势基本一致，且m/z 335峰总体低于m/z 353，表明m/z 335可能是m/z 353的前体。另外，m/z 319化合物的量远高于其它两种化合物，这是因为它不仅可通过LOX作用产生，也可通过非酶催化产生（Cornelia等，2001），所以对照细胞中也存在一定量的m/z 319产物。根据以上实验结果，我们可初步推断SA诱导下，美登木悬浮培养细胞中9-LOX介导的亚油酸代谢途径如图2所示。

维普资讯 http://www.cqvip.com

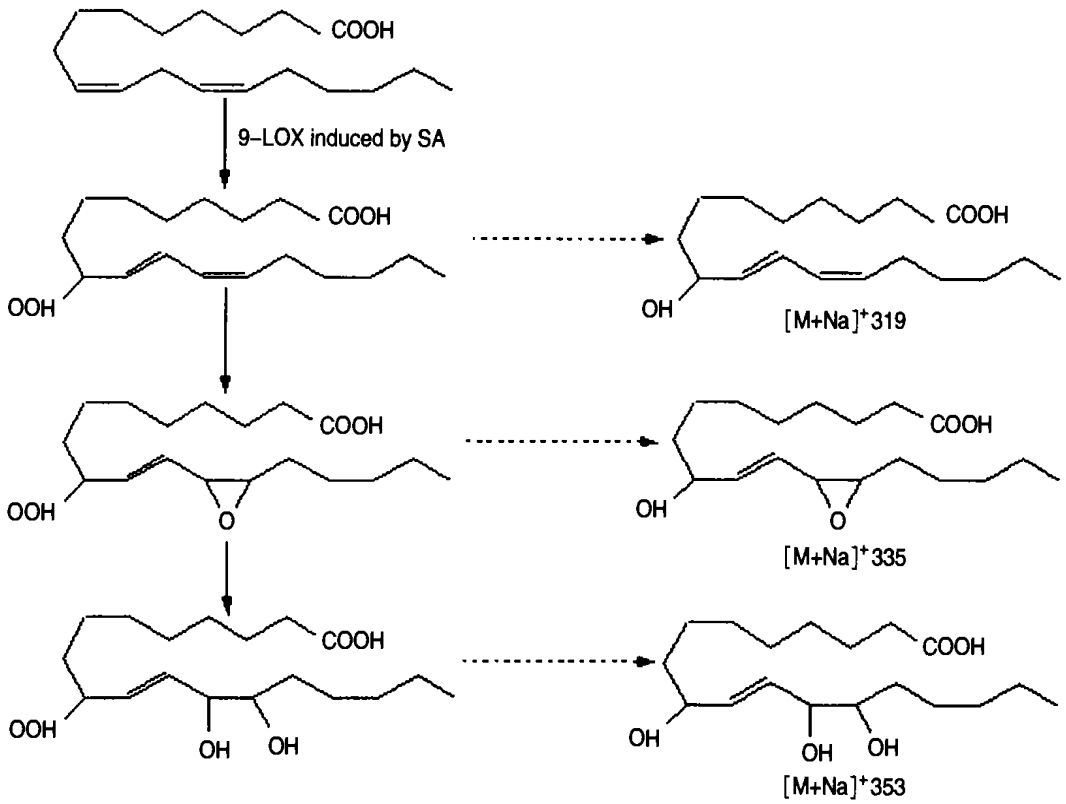

图2　云南美登木悬浮培养细胞中9-LOX介导的亚油酸代谢途径

Fig. 2　The proposed pathway for LOX-dependent metabolism of linoleic acid in the suspension cell cultures of *Maytenus hookeri*

实线箭头所指方向为亚油酸的代谢途径，虚线箭头所指为在提取液中还原剂的作用下实际所提取到的化合物，因为过氧基很不稳定，易转化为羟基。该途径包含了环氧中间体的生成。对于环氧中间体是如何转化为9，12，13-三羟基-10-十八碳烯酸终产物的，还需要进一步的实验来证明。

〔参　考　文　献〕

赵沛基，甘烦远，沈月毛，2003. 乳突果组织培养及愈伤组织中的多羟基脂肪酸［A］. 见：中国植物学会，中国植物学会七十周年年会论文摘要汇编［C］. 北京：高等教育出版社，441—442

Alexander G, 1998. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway［J］. *Prog Lipid Res*, **37** (5): 317—352

Brash AR, 1999. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate［J］. *J Biol Chem*, **274**: 23679—23682

Cornelia G, Feussner I, Schmidt A, *et al*, 2001. Oxylipin profiling reveals the preferentials timulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells［J］. *J Biol Chem*, **276** (9): 6267—6273

Cornelia G, Feussner I, Hamberg M, *et al*, 2002. Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves［J］. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1584**: 55—64

Gan FY（甘烦远），Zheng GZ（郑光植），Peng LP（彭丽萍），*et al*, 1997. Studies on cell fermentation culture of *Taxus yunnanensis*［J］. *Natural Product Research and Development*（天然产物研究与开发），**9**: 97—101

Hause B, Voros K, Kogel KH, *et al*, 1999. A jasmonate-responsive lipoxygenase of barley leavesis induced by plant activators but

维普资讯 http://www.cqvip.com

not by pathogens [J]. *J Plant Physiol*, **154**: 459—462

Helena P, Mario R, 2002. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features [J]. *Plant Physiology*, **130**: 15—21

Heiko W, Irene S, Ekkehardt B, *et al*, 1999. Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves-preferential induction of the reductase pathway by salicylate1 [J]. *FEBS Letters*, **464**: 133—137

Maleck K, Dietrich EW, 1999. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? [J]. *Trends Plant Sci*, **4**: 215—219

Niu CQ (牛长群), Zhu SQ (祝仕清), 2001. LC-MS analysis of related substances in *Ampicillin* and *Amoxicillin* [J]. *Acta Pharmaceutica Sin* (药学学报), **36** (10): 758—761

Siedow JN, 1991. Plant lipoxygenase: structure and function [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **42**: 145—188

Vörös K, Feussner I, Kuhn H, *et al*, 1998. Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (Hordeum vulgare cv. Salome) leaves [J]. *Eur J Biochem*, **251**: 36—44

Yang Y, Shah J, Klessig DF, 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses [J]. *Genes Dev*, **11**: 1621—1639

* *

欢迎订阅2005年《植物资源与环境学报》

"中国期刊方阵"双效期刊　　"江苏期刊方阵"优秀期刊

季刊，单价6元，邮发代号：28-213，统一刊号：CN32-1339/S

《植物资源与环境学报》系江苏省/中国科学院植物研究所、江苏省植物学会及中国环境科学学会植物园保护分会联合主办的学术刊物，国内外公开发行。本刊为BA、CA、CAB、中国生物学文摘、中国环境科学文摘、中国科学引文数据库、万方数据——数字化期刊群、中国学术期刊（光盘版）和中文科技期刊数据库等国内外著名刊库收摘。本刊围绕植物资源与环境两个关系国计民生的中心命题，报道我国植物资源的考察、开发利用和植物物种多样性保护，自然保护区与植物园的建设和管理，植物在保护和美化环境中的作用，环境对植物的影响以及与植物资源和植物环境有关学科领域的原始研究论文、研究简报和综述等。凡从事植物学、生态学、自然地理学以及农、林、园艺、医药、食品、轻化工和环境保护等领域的科研、教学、技术人员及决策者，可以从本刊获得相关学科领域的研究进展和信息。

本刊于1992年创刊，全国各地邮局发行，若错过征订时间或需补齐1992~2004年各期者，请直接与编辑部联系邮购，订价1992~1994年每年8元，1994~2000年每年16元，2001~2005年每年24元（均含邮资）。编辑部地址：南京中山门外江苏省/中国科学院植物研究所内，

邮编：210014，　电话：025-84347016；　Fax：025-84432074

E-mail：nbgxx@jlonline.com 或 zwzy@mail.cnbg.net