J Chin Med 11(3): 135-142, 2000

白英細胞在 Indole-3-butyric acid 處理下脂多醣体的定性分析

盧美光

國立中國醫藥研究所

台北

(1999 年 12 月 21 日受理，2000 年 1 月 11 日收校訂稿，2000 年 1 月 12 日接受刊載)

以 hot phenol / water 法萃取白英細胞脂多醣体，經分子篩色層分析純化。在銀染聚丙稀銨不連續電泳，可見到似階梯狀的電泳條帶分佈。從白英細胞經 Indole-3-butyric acid 1, 5, 10, 20 mg L^{-1} 處理後第 21 天萃取出的脂多醣体，由分子篩色層分析得知，高濃度的 Indole-3-butyric acid (10, 20 mg L^{-1}) 其脂多醣体含醣量高於低濃度的 Indole-3-butyric acid 處理下細胞所合成脂多醣体的含醣量。由電泳結果顯示，低濃度的 Indole-3-butyric acid (1, 5 mg L^{-1})處理下細胞只合成核心寡醣及一個單位的 O-抗原因子。高濃度的 Indole-3-butyric acid (10, 20 mg L^{-1})細胞能合成不同單位數的多醣鏈接到 O-抗原因子上，而形成分子量高的巨型分子。

關鍵字：白英、脂多醣体、Indole-3-butyric acid

縮　寫：脂多醣体(LPS)、Indole-3-butyric acid (IBA)

前　　言

脂多醣体的定義是一個含有 O- 抗原因子(O- antigen)、脂質- A (lipid- A)及核心寡醣 (core polysaccharides) 的巨型醣分子。因其特殊的物理化學性質，如：親水性高、帶電荷、及結構，使此類化合物具有負責細胞內特殊的功能及細胞-細胞間的傳遞物質之能力。目前，已知 LPS 是細菌 outer membrane 的一部分，其構造皆含有 2-keto–3–deoxyoctonate (KDO)及脂質。在電泳分析上，會呈現出階梯狀 (ladder- like) 的條狀分佈。在已知的 LPS 結構中發現其脂質-A 部份所含的脂肪酸的長度，足以跨越 outer membrane 的 bilayer。其核心寡醣的部份，在同一物種內是不變的 (conserved)。其 O-抗原因子所附上的多醣鏈依物種不同而有多樣性 (polymorphism)，此多樣性的形成可能是由於醣的組成不同，或由於所附上的多醣鏈其單位的重複個數不同而有不同。這也是造成 LPS 在革蘭氏陰性菌 (Gram- negative) 和抗体之間專一性的來源，此種識別多

連絡人：盧美光，國立中國醫藥研究所，台北市石牌立農街二段 155-1 號，TEL: 28201999 ext. 7391
FAX: 28264276　e- mail: mklu@cma23.nricm.edu.tw

醣鏈的專一性，使得 LPS 被認為是一個極優的抗体標的。而此三部份在細胞膜上的分布是脂質-A 部份穿越細胞膜 bilayer，由 O-抗原因子帶有醣鏈向細胞外界伸展。這條通道，在植物和微生物發生共生 (symbiosis) 現象中，被認為是菌和寄主 (host) 之間的識別因子。

早期有關脂多醣体的報導是起於微生物，尤其是革蘭氏陰性 (Gram-Negative) 菌類所含脂多醣体的研究。近十年來，植物界對脂多醣体的研究多集中於植物與微生物共生 (symbiosis) 現象中，脂多醣体所擔任寄主與微生物間的專一辨識的角色。尤其對於豆科植物與根瘤菌脂多醣体，在感染過程中的辨識反應許多報告對此有深入的探討 [1-3]。對於，脂多醣体在植物與微生物共生現象的功能有許多假說被人提出，如：負責訊息傳遞、保護微生物免於植物所釋放出的有毒物之侵害、修飾誘發因子 (elicitors) 以干擾植物本身的防衛系統、及提供植物與微生物間細胞融合的適當介面 [4]。在已被 clone 的基因中，其基因的產物與多醣鏈及 O-antigen 的合成、將 O-抗原因子部份與脂質- A 部份連結之用 [5]。

脂多醣体的藥理研究 [6,7]，宣稱脂多醣体是最有利用價值的微生物產物，因其具有抗發炎及增加免疫力的功效。脂多醣体能促進單核白血球 (monocytes) 及多形核白血球 (polymorphonuclear leukocytes) 細胞在離体 (*in vitro*) 及体內 (*in vivo*) 的許多反應，其中不乏和抗發炎的反應有關。其反應機制可能是經由脂多醣体的刺激使得和附著性相關的膜醣蛋白 (glycoproteins) 大量增殖，如：CD11-CD18 [8-9]；或活化氧的代謝、抗炎因子、水解蛋白 lactoferrin 的生成 [10-13]。一般而言，脂多醣体能刺激多形核白血球細胞吞噬微生物的能力及其本身移動的能力，且大量增加血小板活化因子及 leukotriene B4 的生成 [14-15]。近來，Palma 等人 [16](1994) 指出脂多醣体能促進多形核白血球細胞分泌 lactoferrin (一種和離子鍵結的蛋白，其本身可抗發炎)，而增強其對白色念珠菌 *Candida albicans* 的吞噬能力，並由流式細胞儀 (flow cytometry) 的分析，證實其吞噬微生物能力的增加是由於單位嗜中性白血球 (neutrophiles) 吞噬的菌數增加，及具吞噬微生物能力的嗜中性白血球數目增加的結果。

脂多醣体在細胞內合成的種類，表現在電泳條帶上的分布、條帶的數目、及條帶的相對染色程度，可區分為不同的脂多醣体群。Silverio 等人 [17] (1993) 指出脂多醣体表現在電泳條帶上的不同，可能是由於 O-抗原因子側支所含的單糖組成的不同，及參與合成脂多醣体的 polymerase 及 ligase 等蛋白活性及專一性的不同所造成。在血清學 (serology)上，脂多醣体被用來作為標幟 (marker)，以區分用傳統方法難以鑑定的亞種 [18]。再者，以脂多醣体為標幟的優點是其具有穩定的電泳群落分布，使得實驗的重複性高，近來脂多醣体的多型性 (polymorphism)已被用作細菌血清學上分類的依據 [17]。

利用已建立的白英組織及細胞培養体系，我們已進行一系列有關白英次級代謝物生合成的研究，包括 steroidal glycosides, glycoalkaloids 類的細胞產物。Nakamurk [19] (1996) 報導白英有效成份中的 steroidal glycosides，其醣支鏈中的 rhamnose 扮演重要角色，推測和細胞表面的接受器(receptor) 結合。目前，對於親水性高的含醣成份：如醣蛋白、脂多醣体的報導缺乏。本實驗室已於過去一年起始了萃取細胞內脂多醣体的工作，並已建立萃取方法及分子篩色層分析、聚丙稀胺不連續電泳銀染的系統。初步的結果顯示，細胞於不同的生理年齡及不同賀爾蒙處理下，所呈現的分子篩色層及電泳條帶群落不同。本報告報導以脂多醣体為標幟，探討白英細胞在 IBA 處理下，細胞所進行脂多醣体合成的變化。

材料與方法

懸浮細胞培養

利用本實驗室已建立的白英的癒合組織誘導及懸浮細胞培養体系 [20]，作以下的樣品來源。

IBA 的添加

IBA 母液以 95%酒精溶解，在滅菌之前，自各濃度的母液取 10 μl (< 0.1%) 加入 30 ml 2/3 MS basal medium。各處理所加入的白英細胞濃度為 3 mls 細胞沉体積 / 30 ml medium，自添加的第一天起計時。

脂多醣體的萃取

依據 Westphal 及 Jann [21] (1965) 酚-硫酸法 (Phenol-water method)，經 Carlson *et al.*,[22] (1978)及 Carrion *et al.*, [23] (1990) 修改後的方法為主要萃取依據。細胞收穫後，以 0.25 M NaCl 清洗，以 8500 x g，4℃，10 分鐘離心三次。將清洗後的癒合組織或細胞以 10 ml 65℃ ddH_2O 懸浮，加入等量酚，65℃下 15 分鐘、冰浴 15 分鐘、離心 8500 x g 4℃ 20 分鐘，收集水層，蛋白質將分布於酚層。酚層及混合層再以 10 ml 65℃ddH_2O 懸浮、冰浴 15 分鐘、離心 8500 x g 4℃ 20 分鐘，收集水層。將 2 次水層液混合，以 ddH_2O 透析過夜，透析膜孔洞為 12-14000 daltons (Spectrum membranes)，以透析出分子量小於 12-14000daltons 的分子，包括殘留的酚，離心 8500 x g 4℃ 10 分鐘，取上清液，調整透析液為 10 mM $MgSO_4$ 及 50 mMTris pH 7.04，加入 1 mg/ 100ml DN*ase***I** (400-600 kunitz units/ mg), 1 mg/ 100ml RN*ase* **A** (89 kunitz units/ mg)，37℃下反應 4 小時，以消化殘餘的核酸，再加入 10mg /100ml ProteaseK (10-20 units/ mg protein)，37℃下反應 2 小時，以消化所加入的 DN*ase***I** 及 RN*ase* **A**，以 ddH_2O 透析過夜，以透析出 ProteaseK。離心 8500 x g 4℃ 10 分鐘，取上清液。冷凍乾燥，-20℃保存。

分子篩色層分析 (Gel Filtration Chromatography)

Column：Fractogel BioSec (Merck) 110 x 1.5 cm

Buffer：150 mMNaCl, 10 $mMNaH_2PO_4$

Instrument：ADVANTEC SF-2120 Fraction Collector

Flow rate：0.25 ml / min

收集液以酚-硫酸法 [24] 在 OD_{488} 下測吸光值。

聚丙稀胺電泳分析

以 SDS-PAGE 不連續電泳，聚集膠体與分離膠体濃度分別為 4%及 12.5%。電泳完成後以銀染法染色 [25]。

結果與討論

分子篩圖譜

以 hot phenol / water 法萃取，經去除核酸及蛋白質的污染，所得的 LPS，經分子篩色層分析作最後的純化，並自 200- 800 nm U.V.下作吸光掃瞄，只有單一的 OD_{208} 吸收鋒，此為 LPS 結構中 2-keto–3–deoxyoctonate (KDO)特有的吸收鋒，並無出現可能的核酸 OD_{260} 或蛋白質 OD_{280} 或 polysaccharides $OD_{540-700}$ 的吸收鋒，說明以 hot phenol / water 法萃取 LPS，經 DN*ase***I**, RN*ase***A**, Protease，及透吸的處理，所得的 LPS 並無核酸，蛋白，或 polysaccharides 的污染。圖 1 表示 IBA 在 1, 5, 10, 20 mg L^{-1} 濃度下，培養細胞 21 天，所抽出的 LPS 含醣圖譜。其中 IBA 濃度在 10 及 20 mg L^{-1} 處理下有高的吸收鋒，而 IBA 低濃度下 1 mg L^{-1}，其 LPS 的含醣量最低。

銀染聚丙稀銨不連續電泳圖譜

經選取分子篩色層分析中有含醣的部份，進行聚丙稀銨不連續電泳 (SDS-PAGE) 分析，以銀染方式偵測 LPS 在電泳膠片上的分佈。圖 2 為 IBA 10 mg L^{-1} 21 天的電泳圖譜，顯示 No. 52 至 54 含有最多種類的 LPS。其中跑得最前端的電泳條帶，一般認為是核心寡醣的部份。跑得第二快的電泳條帶是核心寡醣再加上一個單位的 O-抗原因子，再往上的是 O-抗原因子再加上二個單位的醣鏈，以此類推。而呈現似階梯狀的電泳條帶分佈。由分子篩圖譜顯示 No. 51 至 54 為吸收鋒最高的區域，此數據和電泳圖譜中 No. 52 至 No. 54 含有最多種類的 LPS 相呼應。圖 3 為 IBA 不同參試濃度下 LPS 合成的電泳圖譜，顯示所有參試濃度下，細胞皆能合成最下方的二個條帶，推測一個是核心寡醣的部份，一個是一單位的 O-抗原因子。高濃度的 IBA (10 及 20 mg L^{-1})，才能形成分子量大的巨型 LPS。

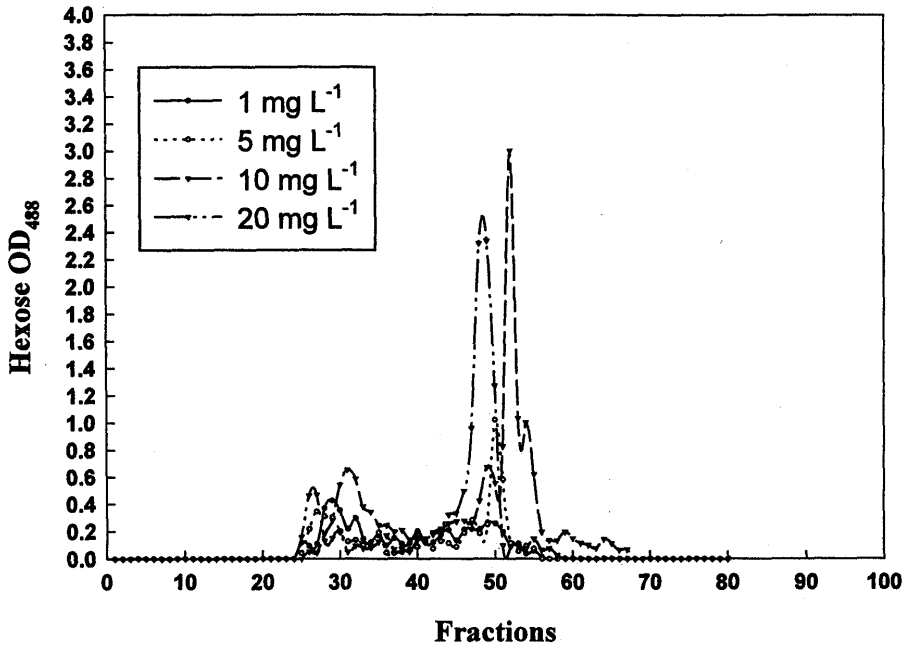

Figure 1. Gel filtration profile of lipopolysaccharides of IBA treated cells for 21 days of *S. lyratum*. Column: Fractogel BioSec 110 x 1.5 cm (Merck); Buffer: 10 mM NaH_2PO_4, 150 mM NaCl, pH 6.8; Flow rate: 0.25 ml / min.

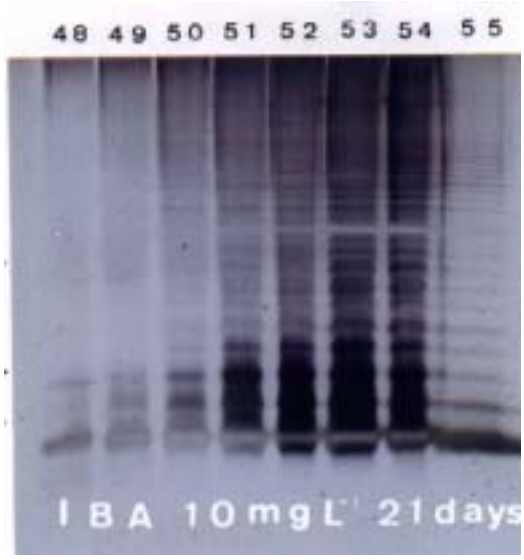

Figure 2. Characterization of LPS in the IBA 10 mg L^{-1} treated cells for 21 days. The SDS-PAGE system was 12.5%T 2.7%C separating gel; 4%T 2.7%C stacking gel, 170V, 10℃. The LPS was initially purified by gel filtration chromatoghaphy on Fractogel BioSec 110 x 1.5 cm. Sample concentration, 10 mg/ml; sample volume 3 ml, 10 mM NaH_2PO_4 ,150 mM NaCl, pH 6.8; flow rate: 0.15 ml/min.

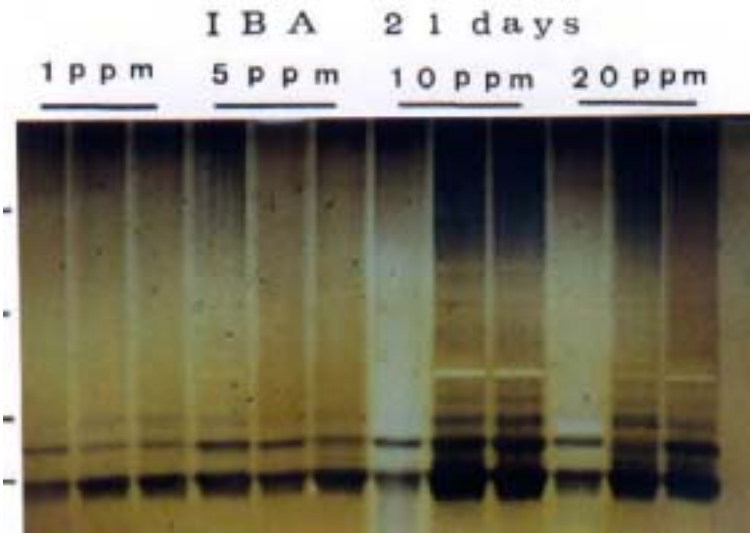

Figure 3. The effect of IBA on the biosynthesis of LPS of *S. lyratum*. LPS were characterized by SDS- PAGE silver staining. Three fractions with high sugar content on the gel filtration chromatography were loaded for each IBA treatment.

目前，有關植物細胞的 LPS 報導缺乏，本文報導白英細胞內 LPS 的定性分析，經由銀染技術可以染出醣分子類化合物在聚丙稀胺電泳上的分布。由本文結果顯示，白英細胞在 IBA 處理下，當細胞處於由添加植物激素而改變細胞生理狀態時，會反應在 LPS 分子合成的複雜度。在 IBA 較高濃度處理下，刺激白英細胞合成分子量大的 LPS，推測其 LPS 所含的多醣体支鏈由為數較多的重複序列所組成。

誌　　謝

本文感謝謝淑麗小姐的電泳技術及廖明玉小姐的酚/硫酸法測醣。本文承國科會 NSC 89-2313-B-077-001 及中國醫藥研究所經費補助，特此感謝。

參考文獻

1. Denarie J, and Roche P *Rhizobium* nodulation signals, pp. 295-324. *In* D. P. Verma (ed.), Molecular signals in plant-microbe communications. CRC Press, Boca Raton, Fla, 1992.
2. Gray J, Maagd R, Rolfe B, Johnston A, and Lugtenberg B. The role of the *Rhizobium* cell surface during symbiosis, pp. 359-376. *In* D.P. Verma (ed.), Molecular signals in plant-microbe communications. Boca Raton: CRC Press, Fla, 1992.
3. Noel K, Rhizobial D. Polysaccharides required in symbiosis with legumes, pp. 341-357. *In* D.P. Verma (ed.), Molecular signals in plant-microbe communications. CRC Press, Boca Raton, Fla 1992 .
4. Goethals K, Leyman B, Eede G, Montagu M, and Holsters M, An *Azorhizobium caulinodans* ORS571 locus involved in lipopolysaccharide production and nodule formation on *Sesbania rostrata* stems and roots. J. Bacteriol. 176(1): 92-99, 1994.
5. Goldman R.C. and Hunt F, Mechanism of O-antigen distribution in lipopolysaccharide. J. Bacteriol. 172:5352-5359, 1990.
6. Morrison D., and Ryan J, Endotoxins and disease mechanisms. Annu. Rev. Med. 38:417-435, 1987.
7. Rietschel E, Scade U, Jensen M, Wollenweber H, Luderitz O, and Greisman S, Bacterial endotoxins. Chemical structure, biological activity and role in septicaemia. Scan. J. Infect. Dis. Suppl. 31:8-17, 1982.
8. Kishimoto T, Jutilia M, Berg E, and Butcher E, Neutrophil Mac-1 and Mel-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. Sci. 245:1238-1241, 1989.
9. Pohlman T, Stannes K, Beatty P, Ochs H, and Harian J, An endothelial cell surface factor(s) induced *in vitro* by lipopolysaccharides, interleukin-1, and tumor necrosis factor increases neutrophil adherence by CDW18-dependent mechanism. J. Immunol.136:458-464, 1986.
10. Guthrie L, McPhail L, Henson P, and Johnston R, Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipoplysaccharides. J. Exp. Med. 160:1656-1671, 1984.
11. Haslett C, Guthrie L, Kopaniak M, Johnston R, and Henson P, Modulation of multiple neutrophil functions by trace amount of bacterial lipoplysaccharides and by preparative methods. Am. J. Pathol. 119:101-110, 1985.
12. Hart, D. L.. Polymorphonuclear leukocytes elastase activity is increased by bacterial lipoplysaccharides: a response inhibited by glucocorticoids. Blood 63: 421-426, 1984.
13. Koivuranta-Vaara P, Banda D, and Goldestein I, Bacterial lipoplysaccharides induced release of lactoferrin from human polymorphonuclear leukocytes:role of monocyte derived tumor necrosis factor alpha. Infect.Immun.

55:2956-2961, 1987.

14. Worthen G, J Seccombe, Clay K, Gutherie L, and Johnston R, The priming of neutrophils by lipopolysaccharides for production of intracellular platelet-activating factor: potential role in mediation of enhanced superoxide secretion. J.Immunol. 140:3553-3559, 1988.
15. Dorfler M, Danner L, Shelhamer J, and Parrillo J, Bacterial lipopolysaccharides priming human neutrophils for enhanced production of leukotriene B4. J.Clin. Invest. 83:970-977, 1989.
16. Palma C, Cassone A, Serbousek D, Pearson C, and Djeu J, Lactoferrin release and interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor production by human polymorphonuclear cells stimulated by various lipopolysaccharides: relationship to growth inhibition of *Candida albicans*. Infection and immunity 60(11) :4604-4611, 1994.
17. Silverio F, Cambra M, Gorris M, Corzo J, and Lopez M, Lipoplysaccharides as determinants of serological variability in *Pseudomonous corrugata*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1805-1812, 1993.
18. Scarlett C, Fletcher J, Roberts P, and Lelliott R, Tomato pith necrosis by *Pseudomonous corrugata*. N. sp. Ann. Appl. Biol.88:105-114, 1978.
19. Nakamura T, Komori C, Lee Y, Hashimoto F, Yahara S, Nohara T, and Ejima A, Cytotoxic activities of *Solanum* steroidal glycosides. Biol. Pharm. Bull.19(4):564-566,1996.
20. Lin Y, and Lu M, Studies on in vitro production of antimutagenic activity by tissue culture of *Solanum lyratum*. Chinese Agron J. 7:255-265, 1997.
21. Westphal O, and Jann K,Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol – water and further applications of the procedure. Methods Carbohydr. Chem. 5: 83-91, 1965.
22. Carlson R, Sanders R, Napoli C, and Albersheim P, Host-symbiont interaction. III. Purification and partial characterization of *Rhizobium* lipopolysaccharides. Pl. Physiol. 62:912-917, 1978.
23. Carrion M, Bhat U, Reuhs B, and Carlson R, Isolation and characterization of the lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 172:1725-1731, 1990.
24. Zevenhuizen L, Scholten-Koerselman I, and Posthumus M, Lipopolysaccharides of *Rhizobium*. Arch. Microbiol. 125:1-8, 1980.
25. Tsai C, and Frash C, A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gel. Anal. Biochem. 119:115-119, 1982.

J Chin Med 11(3): 135-142, 2000

STUDIES OF LIPOPOLYSACCHARIDES OF IBA TREATED *SOLANUM LYRATUM* CELL SUSPENSION CULTURE

Mei-Kuang Lu

National Research Institute of Chinese Medicine
Taipei, Taiwan

(Received 21th December 1999, revised Ms received 11th January 2000, accepted 12th January 2000)

Lipopolysaccharides of *Solanum lyratum* were purified through hot phenol / water method and gel filtration chromatography. The characteristics of lipopolysaccharides are the ladder –like patterns shown on the SDS -polyacrylamide gel electrophoresis. Comparisons were made between Indole -3- butyric acid (IBA) 1, 5, 10, 20 mg L^{-1} treated cells for 21 days. The gel filtration profiles showed that high concentrations of IBA (10 and 20 mg L^{-1}), the sugar contents of lipopolysaccharides were higher than that of the low concentrations of IBA (1 and 5 mg L^{-1}) treated cells. Only core polysaccharides and one copy of O- antigen polysaccharides were synthesized for low concentrations of IBA (1 and 5 mg L^{-1}) treated cells. Cells synthesized various repeat units of polysaccharides on the O- antigen side chain under high concentrations of IBA (10, and 20 mg L^{-1}) treatment.

Key words: *Solanum lyratum*, Lipopolysaccharides, Indole –3- butyric acid .

Correspondence to: Mei-Kuang Lu, National Research Institute of Chinese Medicine, Taipei, Taiwan. Tel: 28201999 ext. 7391, Fax: 28264276, e-mail: mklu@ema23.nricm.edu.edu.tw