

## 5-氨基乙酰丙酸的光动力应用研究进展

王俊卿 张肇铭\*

(山西大学生命科学与技术学院 太原 030006)

**摘要:** 对光合细菌、藻类及其它细菌的 5-氨基乙酰丙酸 (5-ALA) 产量进行了对比, 类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 在黑暗、厌氧条件下培养, 可产生大量的胞外 5-ALA。5-ALA 在农业生产中作为光动力除草剂、杀虫剂取得了很好效果。并且, ALA 对提高植物的抗盐、抗冷冻能力也有一定作用。近年来, ALA 在癌症治疗、肿瘤诊断方面也得到了广泛应用。

**关键词:** 5-ALA, 吡咯, 卟啉, 光动力破坏

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0136-05

### Biosynthesis, Biotechnological Production and Applications of 5-Aminolevulinic acid

WANG Jun-Qing ZHANG Zhao-Ming

(College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006)

**Abstract:** Microbial production of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) by photosynthetic bacteria compared to other bacteria and algae was reviewed. During anaerobic cultivation of the *Rhodobacter sphaeroides* mutant strain, control of the redox potential was effective or producing large amounts of extracellular ALA. ALA has been practically applied in agriculture as herbicide, pesticide and growth-promoting factor for plants. New agriculture applications including salt tolerance and cold temperature tolerance of plants were also desired. Finally recent medical application for cancer treatment, tumor diagnosis and other clinical uses were discussed.

**Key words:** 5-ALA, Tetrapyrroles, Porphyrin, Photodynamic destruction

5-氨基乙酰丙酸 (5-ALA) 是卟啉、叶绿素、及  $V_{B12}$  等四吡咯生物合成的中间代谢产物。5-氨基乙酰丙酸可作为一种可生物降解的杀虫剂、除草剂<sup>[1]</sup>。但由于化学合成技术上的问题, 5-氨基乙酰丙酸仍未能大批量生产。在生物合成方面, 由于细菌、藻类 5-氨基乙酰丙酸细胞外分泌的量很低, 所以也未能用于实际生产。不过, 有人提出类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 在培养过程中阶段性加入乙酰丙酸 (LA) 可使 5-氨基乙酰丙酸的产量相对提高<sup>[2]</sup>。所以近年来, 光合细菌的变异株被广泛应用于 5-氨基乙酰丙酸生产的应用研究。

5-氨基乙酰丙酸在农业生产中不仅可作为除草剂、杀虫剂, 还可提高植物的抗盐、抗冷冻能力。此外, 5-氨基乙酰丙酸也被广泛用于肿瘤的诊断及癌症的治疗方面。

### 1 5-氨基乙酰丙酸的代谢途径及生物合成

5-氨基乙酰丙酸是合成四吡咯类如卟啉、叶绿素及  $V_{B12}$  等的重要中间代谢产物。5-ALA 的生物合成有两条途径: (1) C-4 途径, 由琥珀酰 CoA 开始; (2) C-5 途径, 由谷氨酸开始。在 C-4 途径中, 琥珀酰 CoA 是通过 TCA 循环合成的, 而在某些细菌中, 琥

\* 联系人

收稿日期: 2003-07-15, 修回日期: 2003-10-10

琥珀酰 CoA 是由丙酰 CoA 通过甲基丙二酰 CoA 途径得到的<sup>[3]</sup>。ALA 合成酶 (ALAS) 是四吡咯合成的限制酶, 受 *HemA* 和 *HemT* 基因的反馈调节。谷氨酸是 ALAC-5 途径合成的起始物, 并且受 *HemA* 和 *HemM* 编码的等位酶的调控。Ikemura<sup>[4]</sup> 提出 *HemM* 对 *E. coli* ALA 的合成是必需的。在细菌和藻类中 ALA 主要通过 C-5 途径合成, 而厌氧光合细菌 ALA 的合成主要是通过 C-4 途径。乙酰丙酸 (LA) 可提高藻类和兼性厌氧细菌的 ALA 产量, 因为它降低 ALA 脱水酶 (ALAD) 活性, 从而抑制了细胞色素—血红素的合成。

## 2 光合细菌的 ALA 产量

光合细菌也可合成四吡咯, 但直到应用 LA 作为抑制剂以前光合细菌的 ALA 的产量仍然很低, 但在 *R. sphaeroides* 的培养基中间歇性分 3 次加入 LA, 在光照 (5,000 lx) / 厌氧条件下, 可使 ALA 生成量提高, 菌体对于丙酸的利用率要大于其它有机酸。*R. sphaeroides* 合成 ALA 的 C-4 途径中, 由甲基丙二酰 CoA 合成琥珀酰 CoA, VB12 是甲基丙二酰 CoA 变构酶的必需辅助因子, 通过加入 LA 可使 *R. sphaeroides* 的 ALA 积累量达 16 mmol/L, 这样就达到了 ALA 的实际应用水平。不过, 利用光合细菌进行 ALA 生产的缺点是需要光照, 而且一套生物反应系统及大批量生产的照明费用都相当高。因此, 还需对 *R. sphaeroides* 突变株的厌氧生产工艺进行进一步的改进。Kamiyama 等最终建立了一套 ALA 商业化生产模式<sup>[5]</sup>。

由于 ALAS 是细胞合成 ALA 的必需酶, 但它极易被氧抑制, 故通气状况对 ALA 的生产有显著影响。必须提供一个既有利于细胞有氧生长, 又利于 ALA 无氧累积的环境。ALA 生产的典型条件如下: *R. sphaeroides* 突变株 CR-520 有氧 (氧化还原电位 ORP > 0 mV) 培养 48h, 然后转为微厌氧 (ORP 30 ~ 0 mV), 发酵 96h 后, 可产生 12 mmol/L 的 ALA, 若控制 ORP (-17 mV), 可使积累量达到 14.3 mmol/L, 在通常的 ORP (0 ~ 105 mV), 由于 ALAS 被抑制, 所以产量很低。过低的 ORP (低于 -31 mV) 会抑制细胞生长和呼吸, 而过低的能量则会抑制 ALA 的合成。

甘氨酸是 ALA 生产的另一重要因子, 谷氨酸加入过多会由于其自身代谢产物氨的积累而抑制细胞生长, 另外, ALA 在碱性条件下不稳定, 因此 ALA 的生产必需在微酸性条件下进行。

小球菌属 (*Chlorella*) 的有些种可在黑暗/厌氧条件下产生 ALA, 但与 *R. sphaeroides* 相比是很低的<sup>[6]</sup>。关于 ALA 生产的基因调控, Mariet<sup>[7]</sup> 报道将 *R. sphaeroides* 的 *HemA* 转入 *E. coli* 细胞, 可使完整细胞的 ALA 产量由原来的 2.25 mmol/L 提高到 22 mmol/L。将大豆慢生根瘤菌 (*B. japonicum*) 的 *HemA* 转入 *E. coli*, 通过 ALAS 高表达, 可使 ALA 的产量达到 20 mmol/L, 虽然其产量与 *R. sphaeroides* 突变株相比仍然较低, 但其培养时间是 14h, 而 *R. sphaeroides* 突变株培养时间是 96h, 所以重组 *E. coli* 将是今后 ALA 大规模生产的一项很有前景的生物技术。

## 3 ALA 的应用研究进展

### 3.1 可生物降解的光动力除草剂

四吡咯依赖型光动力除草剂 (Tetrapyrrole-dependent photodynamic herbicide, TDPH), 是一些可促进植株大量积累叶绿素、血红素代谢的中间产物——吡咯的一些复合物, 光照时, 这些化合物所合成的吡咯可使细胞单线态氧敏感化, 从而通过氧化细胞膜而杀死有害植株。TDPH 通常由一个 5C 氨基酸、5-ALA 及一种化学调节剂组成。其中氨基酸是合成四吡咯的骨架, 化学调节剂则可改变四吡咯

的合成及积累模式<sup>[8]</sup>。

**3.1.1 代谢生成的四吡咯对叶绿体的影响：**卟啉可使 ALA 对昆虫等动物组织的破坏作用加强，而  $Mg^{2+}$  则可促进其对植物组织的光动力破坏作用。Amindari<sup>[9]</sup> 对分离到的黄瓜叶绿体光照培养，观察吡咯化合物对色素蛋白合成的影响。他利用荧光光度计对新鲜叶绿体膜内吡咯代谢 (77K) 进行了分析研究。由于在叶绿体中，叶绿素 a、b 与类囊体多肽呈共价结合，这种结合使电子传递组分和能量水平与在酯溶剂中不同，从而使其光谱特性也发生较大变化。并且，由于复合物的结构邻近效应，一些叶绿素多肽将它们自身的活化能传给了相邻的其它荧光复合物，而未以荧光形式将能量释放掉，这些荧光性叶绿素多聚肽与其它复合物的联系被破坏以后，会释放荧光。因此，被叶绿体吸收的光能的一部分可通过光合作用转化成化学能，另一部分则以荧光等形式逸散。可合成四吡咯的化合物中，有些能促进叶绿素的光降解，其降解效应可通过荧光光度计检测 (77K)，表现为叶绿素 a、b 的消失和叶绿素降解产物的出现<sup>[10]</sup>。

**3.1.2 TDPH 作用选择性的分子基础：**最初，人们认为光动力除草剂的作用模式是无选择性的，但是进一步在实验室或可控制环境下的研究表明，ALA 与不同调节物结合可使其光动力除草选择性表现显著差异。该选择性似乎与 MV、DV 四吡咯在不同植物中的积累能力有关，不同植物对 TDPH 调节剂的敏感性不同。

TDPH 的效能主要依赖于不同植物类群累积四吡咯的特性，它是 TDPH 活性的调节物。据推测可通过某些化合物调节叶绿素的生物合成途径，原理就是通过促进 ALA 处理的植物中某些类群的个体累积“错误型”MV 或 DV 吡咯，而另一类群的个体则累积“正确型”吡咯来实现。目前研究发现 14 种化合物可与 ALA 协作促进叶绿素的合成，因而，它们被认为是 TDPH 的调节物，并根据它们对叶绿素合成途径的不同影响将其分成 4 类<sup>[11]</sup>。

为了研究是否某一化合物可作为四吡咯类光动力除草剂的调节物，将其单独，或与 ALA 一起喷洒植株，之后将处理的植株黑暗培养几小时，从而使大量四吡咯蓄积，分析四吡咯含量后，光照培养，在光照第一小时内，黑暗培养蓄积了大量四吡咯的植株，就会表现出迅速的光动力破坏作用，无蓄积的植株则不表现光动力破坏作用，故将它们分别称为四吡咯的促进剂、诱导剂和抑制剂，并进一步分析 ALA 的存在与否对四吡咯的累积的影响，确定其调节模式。

根据作用机制可将它们分为以下 4 种不同类型：(a) ALA 向 DV 叶绿素转化的促进剂；(b) ALA 向 MV 叶绿素转化的促进剂；(c) 四吡咯累积的诱导剂；(d) MV 叶绿素合成的抑制剂。上述 4 种调节剂中，只有诱导剂才能在无外源 ALA 时引发四吡咯的合成，其它 3 种调节剂都不能在无外源 ALA 下引起四吡咯含量的显著提高。总之，ALA 与诱导剂联合使用，效果要显著高于其单独使用，从而使其光动力除草效果显著提高。

此外，不同植物对 TDPH 调节剂的反应不同。对黄瓜、大豆等几类植物代表种的研究发现：(a) 调节剂对不同类群的植物叶绿素合成途径的调节方式是不同的；(b) 同一类群内，不同种间叶绿素合成的调节效应相似；(c) 同一类调节物对某一种植物叶绿素合成的调节效应相同。由此可见，某一调节物对属于某一类群的特定种群的叶绿素的调节方式是可预测的，即一旦某一调节剂对某一种群的调节方式确定，就可以推广到整个类群。随着二维、三维电脑模式的成功应用，现在已有上百种的 TDPH 调节剂被广泛应用于生产实际。

**3.2 光动力杀虫剂** 光动力杀虫剂是光动力除草剂的直接拓展，因为动植物在四吡咯

生物合成过程中由 ALA 向卟啉的转化机制是相同的。故人们推测吡咯的光动力破坏作用应该对害虫也有效。对粉纹夜蛾用 ALA (40mmol/L) + 双吡啶 (Dpy, 30mmol/L) 喷洒, 先黑暗培养一段时间, 可使昆虫体内的四吡咯积累, 之后光照, 几小时内昆虫就会由于体液流失而干死, 还发现卟啉的累积量与昆虫的光照致死率成正相关<sup>[12]</sup>。

**3.2.1 ALA 与 1,10-二氮杂菲 (Oph) 或 2,2-双吡啶的杀虫效果:** 将 ALA (6mmol/L) 与 Oph (12mmol/L) 一起加入昆虫的日粮中, 黑暗培养 17h 后迅速作四吡咯检测, 发现有大量卟啉蓄积, 曝光后, 昆虫剧烈抽搐、呕吐, 20~40s 内死亡<sup>[13]</sup>。用 ALA 与 Dpy 混合饲喂结果也表明, 四吡咯积累量与昆虫的死亡率成正相关。光动力除草剂结构-功能研究数据库的基础上, 人们对数据库列出的 150 种除草剂进行了杀虫剂试验, 观察它们是否具有杀虫特性。结果表明有分属 10 类共 36 种的化合物有效 (致死率 70% 以上)。

**3.2.2 四吡咯在不同害虫体内蓄积的组织、细胞及亚细胞位点:** 随着对杀虫剂作用模式的深入了解, 人们对四吡咯在不同种类害虫体内蓄积的组织形态、细胞及亚细胞位点进行了研究。用 ALA (40mmol/L) 与 Dpy (30mmol/L) 喷洒 15 龄昆虫, 然后分离表皮、淋巴和肠道, 分别检测其色素蛋白成分。以 1 个蛋白单位为基础, 在血淋巴中检测到 59% 卟啉, 肠道 35%, 表皮 6%<sup>[14]</sup>。为进一步确定昆虫不同组织器官对杀虫剂的反应, 将 4 种害虫的不同组织器官分别用 ALA + Dpy 或 ALA + Oph 先进行黑暗培养, 在 2h 曝光前后分别测定其耗氧量, 耗氧量下降表明光动力致死或细胞死亡。用 ALA + Oph 或 Oph 培养的中肠光照 2h 后耗氧量下降 30%, 这说明杀虫剂可能引起光动力损伤或线粒体死亡。之后, 又给粉纹夜蛾以日粮形式加入 ALA (4mmol/L) + Oph (13mmol/L), 黑暗培养后, 对昆虫卟啉蓄积的不同位点检测发现, 大量卟啉主要存在于线粒体 (37%)。为确定线粒体卟啉积累量对线粒体功能损伤的影响, 将用 ALA (4mmol/L) 与 Oph (13mmol/L) 黑暗培养 17h 的昆虫线粒体分离, 暴露于 900w/m<sup>2</sup> 白色荧光下, 25℃, 30min, 检测线粒体标志酶: 琥珀酸氧化酶、NADH 脱氢酶、NADH 细胞色素 c 还原酶的活性, 结果表明, 光照前 ALA (4mmol/L) 与 Oph (13mmol/L) 处理对线粒体酶活性稍有减弱作用, 而光照后, 富含卟啉的线粒体与对照相比, 细胞色素 c 还原酶活性迅速降低<sup>[15]</sup>, 这也说明单线态氧可能促进了光照灭活的线粒体细胞色素 c 还原酶活性。

**3.3 光动力抗癌制剂** 随着光动力除草、杀虫技术的发展, ALA 对卟啉的诱导作用也开始应用于对癌细胞的光动力杀伤方面, 通过对 ALA 在肿瘤方面的大量研究表明, ALA 对不同的肿瘤细胞如卵巢癌、膀胱癌、胰腺癌、结肠癌等的口服、系统剂量都具有显著的疗效。ALA 在癌症的光动力治疗上的成功基于 5-ALA 的独特性。由于 ALA 是一个小分子水溶性化合物, 易穿过细胞膜, 而且, 由 ALA 介导的卟啉的光活化所需能量低于普通的光敏药物, 易被变形细胞吸收。此外, 在给药后 16~48h 内 ALA 和卟啉就可从循环系统中清除<sup>[16]</sup>, 减小了对周围细胞造成伤害的可能。

1,10-Oph 对 ALA 治疗效果的增强作用, 研究表明, 四吡咯调节物 1,10-Oph 可促进 ALA 的合成, 从而有助于卟啉的蓄积、细胞变形及癌细胞坏死。(1) 1,10-Oph 和 ALA 对癌细胞坏死的诱导作用: 将迅速增殖的哺乳类细胞用 1.0mmol/L ALA 处理, 黑暗培养 3.5h 后, 可引起大量卟啉的蓄积, 之后光照, 30min 内蓄积的四吡咯就会触发被处理细胞的致死作用。若与 1,10-Oph 联合作用, 卟啉的积累及癌细胞的分解都会显著加强。但是, 生长缓慢的未变形细胞经 1,10-Oph 和 ALA 处理后, 不能蓄积大量的卟啉, 需先用刀豆凝集素 A (CON A) 刺激其增殖<sup>[17]</sup>。总之, 1,10-Oph 和 ALA 对肿瘤细胞坏死的诱导作用, 已经从瘤体组织形态及解剖病理学方面得到了验证, 并且, 不会对周围细

胞产生任何的毒害作用。(2) 变形细胞中卟啉的细胞内定位、运输: 目前, 虽然对卟啉的生物合成、积累进行了一些研究, 但对变形细胞卟啉的细胞内定位、运输还存在一些争议。据推测正常细胞内卟啉合成需细胞质、线粒体的协作。已证实, ALA 合成即卟啉合成途径的第一阶段发生在线粒体中。接着, ALA 被运输到细胞质中, 转变为粪卟啉 (Comprogen III), 该转化是在一种水溶性酶的催化下进行的<sup>[18]</sup>, 近来, 有学者对这种水溶性酶进行了克隆, 但并未确定其细胞定位。还有研究表明, 正常细胞中 Comprogen 可通过一种未知机制运输到线粒体, 参与进一步代谢。而在损伤线粒体中, Comprogen 氧化酶和卟啉氧化酶将 Comprogen 催化生成卟啉, 然后卟啉在亚铁螯合酶作用下, 插入一个  $\text{Fe}^{3+}$  合成血红素, 接着血红素和卟啉通过未知机制被运送到其它细胞器。Bedwell 等<sup>[19]</sup>发现粪卟啉合血红素可与线粒体的外周受体 (M-PBR) 结合, 而 M-PBR 的拮抗剂可抑制 Comprogen 向血红素的转化。Kennedy<sup>[20]</sup>等提出用 Oph 处理的变形细胞中, ALA 向 Comprogen 转化的位点在细胞质, 接着, Comprogen 被转移到受损线粒体转变为卟啉, 且此过程需耗能。

#### 4 ALA 的应用前景

ALA 是血红素和叶绿素生物合成的重要组分, 对动植物的代谢都非常重要, ALA 在农业、医学方面的应用研究很有成效, 尤其是 ALA 在癌症治疗、肿瘤诊断及其它临床应用方面值得重视。近来, 有报道 ALA 还可作植物生长调节剂, 可见, 它在这些领域的应用是很有前景的。

但是, 目前 ALA 生产存在的问题是成本较高, 对 *R. sphaeroides* 突变株的基因调控并不能使 ALA 的生产水平提高, 所以, 如何在降低 ALA 生产成本的同时, 提高其生产水平, 将是今后的研究热点。

#### 参 考 文 献

- [1] Duke S O, Rebeiz C A. Porphyrin Pesticides: Chemistry, Toxicology and Pharmaceutical Applications, 1994, 71 ~ 79.
- [2] Andren T, Briesid T, Ormerod J. Ferns Microbiol Lett, 1993, 19: 303 ~ 306.
- [3] Ano A, Funashi H. J Biosci Bioeng, 1999, 88: 57 ~ 60.
- [4] Ikemi M. Gege, 1992, 121: 127 ~ 132.
- [5] Kamiyama H. J Biosci Bioeng, 2000, 78: 48 ~ 55.
- [6] Nishikawa S. J Biosci Bioeng, 1999, 87: 798 ~ 804.
- [7] Mariet J. Gene, 1996, 62: 3560 ~ 3566.
- [8] Rebeiz C A, Amindari S, Reddy N K, et al. Porphyrin Pesticides: Chemistry, Toxicology, and Pharmaceutical Applications, 1994, 48 ~ 64.
- [9] Amindari C A. Acta Sci, 1995, 244: 204 ~ 213.
- [10] Duggan J X, Rebeiz C A. Biochim Biophys Acta, 1982, 714: 248 ~ 260.
- [11] Bassi R, Rigoni G M. Photochem Photobiol, 1990, 52: 1187 ~ 1206.
- [12] Rebeiz C A, Juvik C C, Rebeiz C E. Biochem Physiol, 1990, 36: 201 ~ 207.
- [13] Rebeiz C A, Lee J A, Juvik C C. Crit Rev Plant Sci, 1995, 14: 329 ~ 366.
- [14] Gut L K, Lee J A, Juvik C C. Pest Biochem Physiol, 1994, 50: 1 ~ 14.
- [15] Lee K, Rebeiz C A. Light Activated Pesticides, 1995, 152 ~ 164.
- [16] Kennedy J, Pottier R H. J Photochem Photobiol Biol, 1990, 6: 143 ~ 148.
- [17] Regula J, Ravi B, Bedwell J A, et al. Br J Cancer, 1994, 70: 248 ~ 254.
- [18] Orth K, Konig K, Genze F. J Cancer Res Clin Oncol, 1994, 120: 657 ~ 661.
- [19] Bedwell J, McRoberts A J, Brown S G. Br J Cancer, 1992, 65: 818 ~ 824.
- [20] Kennedy J C, Pottier R H. J Photochem Photobiol Biol, 1992, 14: 275 ~ 292.