

掌叶大黄细胞悬浮系统和根培养系统对鬼臼毒素的生物转化研究

杨世海¹, 刘家源², 于博³, 刘晓峰^{4*}

(1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118; 2. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150080;

3. 华禾药业股份有限公司, 北京 100035; 4. 吉林亚泰(集团)股份有限公司, 吉林 长春 130031)

摘要:目的 对鬼臼毒素的生物转化进行研究。方法 利用掌叶大黄细胞悬浮系统和根培养系统进行生物转化。采用色谱技术和波谱手段对转化产物进行分离鉴定。结果 加入鬼臼毒素对掌叶大黄细胞悬浮系统和根培养系统的pH值无明显影响; 两种组培系统均能转化鬼臼毒素。在本实验条件下, 细胞悬浮系统使73.8%的鬼臼毒素发生了转化, 根培养系统中使56.3%的鬼臼毒素发生了转化。两种系统对鬼臼毒素的转化产物不同, 前者只转化生成鬼臼苦素, 后者转化生成表鬼臼毒素等多种化合物。结论 掌叶大黄细胞悬浮系统和根培养系统均能有效转化鬼臼毒素。

关键词: 掌叶大黄; 细胞悬浮系统; 根培养系统; 鬼臼毒素; 鬼臼苦素; 表鬼臼毒素; 生物转化

中图分类号: R 282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)05-0763-04

Biotransformation of podophyllotoxin by cell suspension and root culture systems of *Rheum palmatum*

YANG Shi-hai¹, LIU Jia-yuan², YU Bo³, LIU Xiao-feng⁴

(1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. College

of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150080, China; 3. Huahe Pharmaceutical Co.,

Ltd., Beijing 100035, China; 4. Jilin YaTai Group Co., Ltd., Changchun 130031, China)

Abstract: **Objective** To investigate the biotransformation of podophyllotoxin by cell suspension culture and root culture systems of *Rheum palmatum*. **Methods** Plant tissue culture technology was employed. The products were isolated by silica gel column chromatography and their structures were elucidated by spectral methods. **Results** Adding of podophyllotoxin had no obvious effects on the pH value of cell suspension culture and root culture systems of *R. palmatum*. In the case of present study, 73.8% of podophyllotoxin was converted by cell suspension culture and 56.3% by root culture. The products were different between the two culture system. Podophyllotoxin was converted into picropodophyllin with cell suspension culture system and many other products besides epipodophyllotoxin with root culture system. **Conclusion** Both of cell suspension culture and root culture systems of *R. palmatum* are able to convert podophyllotoxin.

Key words: *Rheum palmatum* L.; cell suspension culture system; root culture system; podophyllotoxin; picropodophyllin; epipodophyllotoxin; biotransformation

生物转化是利用生物体系将加入到生物反应系统中的外源有机底物某一特定部位或功能基团进行特异性的结构修饰, 以获得有价值的不同化学产物的工艺^[1]。用植物细胞悬浮培养物对外源底物进行生物转化从而对其结构进行修饰, 以获得更有意义的产物报道很多^[2~4]。目前已知离体培养植物细胞具有酯化、氧化、葡萄糖基化、异构化、甲基化、去甲基化、乙酰化等多种生物转化能力^[5]。它具有反应选择性强、反应条件温和、副产物少、不造成环境污染和后处理

简单以及可以进行传统有机合成所不能或很难进行的化学反应等优点, 因此有着较大的理论及实际应用价值。利用生物转化的这些特点, 对资源丰富、量较高却又未得到充分利用的天然化合物和部分人工合成的活性化合物进行生物转化, 可以从中找到有开发价值的新的活性先导化合物及其可能的生产方法, 因此有着较大的理论及实际应用价值。

鬼臼毒素及相关木脂素是一类具有显著细胞毒性的天然活性物质, 这类物质主要来自鬼臼属植物,

* 收稿日期: 2007-09-15

作者简介: 杨世海(1962—), 男, 吉林通榆人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要研究方向为中药资源与中药生物技术。

统称为鬼臼类木脂素。其化学结构皆具有2,3-丁内酯-4-芳基四氢萘的母核。20世纪40年代证实鬼臼毒素具有抗癌活性,但由于其毒副作用大,限制了临床的直接应用^[6]。多年以来,为获得高活性、低毒的鬼臼衍生物,科研工作者对鬼臼类木脂素的结构改造做了大量工作,其中也包括生物转化法的应用^[7~10]。

本实验利用掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 细胞悬浮系统和根培养系统对鬼臼毒素进行了生物转化研究,试图确定其转化情况及其相关转化产物,为鬼臼类结构修饰探索新途径,同时对掌叶大黄不同培养系统的生物转化能力和特点进行比较研究,为寻找可能的可用于生物转化的酶系统做基础性探索。

1 材料和方法

1.1 材料:鬼臼毒素由北京大学药学院生物技术室研究人员从鬼臼 *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying 中分离得到,经液相色谱检测,质量分数>98%。

1.2 细胞悬浮系统和根培养系统的建立

1.2.1 植物材料与无菌苗的获得:掌叶大黄果实购自陕西省陇县咸宜关村,经北京大学药学院生药研究室郑俊华教授鉴定为掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.。挑选粒大饱满的掌叶大黄果实,撕去果翅,在5% H₂O₂ 中超声振荡5 min 后,静止浸泡灭菌2 h。用灭菌水洗3次后,置于灭菌滤纸上吸干表面水分,接种于不含激素的MS琼脂培养基上,培养箱温度22℃,光照12 h/d,光照强度1 500~2 000 lx。15 d后种子萌发,18 d后真叶陆续长出。

1.2.2 细胞悬浮系统:取掌叶大黄无菌苗下胚轴、子叶和真叶作为外植体,在无菌条件下接种于MS琼脂培养基(0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L 2,4-D)上,诱导愈伤组织。培养条件:pH 5.8,培养温度(25±1)℃,日光灯光照12 h/d。20 d后愈伤组织形成。在同样培养基每20 d继代一次。连续继代5次后转入MS液体培养基中振荡培养,培养温度(25±1)℃,摇床速度80 r/min。第1次接种20 g 松软愈伤组织于30 mL 培养基中,每20~25天继代1次。第2次继代培养基为50 mL,第3次继代于100 mL 培养基中培养5 d后即可用于生物转化研究。

1.2.3 根培养系统:切取光照培养箱中生长的掌叶大黄无菌苗的须根0.5 g,继代于5 mL 的1/2 WP (0.1 mg/L NAA + 0.1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L 2,4-D,无机盐浓度为正常值一半)培养基中,pH 5.8,经4次继代后,第5次继代于100 mL 同样的培养基中,用于生物转化研究。

1.3 鬼臼毒素的生物转化和转化产物的分离鉴定

1.3.1 鬼臼毒素的生物转化:称鬼臼毒素10 mg 溶于0.5 mL 无水乙醇中,使其完全溶解。经膜(0.45 μm)滤过除菌后,在无菌条件下,按100 mg/L 的量加入到不同的掌叶大黄培养系统中进行生物转化。其中,掌叶大黄根培养系统中根鲜质量约20 g,培养于250 mL 三角瓶中的100 mL 培养基中。掌叶大黄细胞悬浮系统中细胞鲜质量30 g,培养基同样是100 mL。以未加入活性化合物的相同培养系统作空白。

1.3.2 转化系统pH 值的测定:大黄根培养系统和细胞悬浮系统经14 d后收获培养基,收获后的培养基先测定pH 值。

1.3.3 转化产物的分离鉴定:收获后的培养基用醋酸乙酯萃取,50℃减压浓缩,用HPLC法检测加入系统中底物的变化情况。对应的空白培养系统的培养基同时收获,并加入同样量的鬼臼毒素后随收获的转化培养基一同处理,作空白对照。

将醋酸乙酯提取物经硅胶柱色谱,用醋酸乙酯洗脱,以去除醋酸乙酯难以洗脱部分。洗脱液浓缩后用于液相色谱分析和制备。

色谱条件: Spectra Series P100 高效液相色谱仪, Spectra Series UV 100 紫外检测器,检测波长254 nm, phenomenex prodigy 5 μODS (3) 100A 色谱柱(250 mm × 4.60 mm), 60% 甲醇水作流动相。

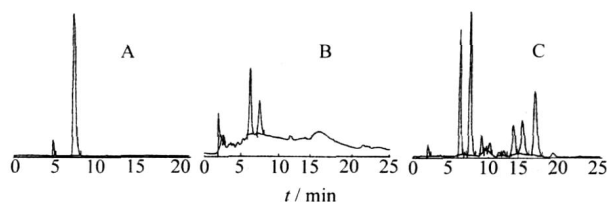
2 结果

2.1 细胞悬浮系统和根培养系统的pH 值:转化前两周的pH 值均为5.8。培养14 d后,细胞悬浮系统pH 值变为5.1,空白培养基pH 值为5.2;根培养系统pH 值为5.4,空白培养基pH 值同样为5.4。说明加入鬼臼毒素对系统pH 值无明显影响。

2.2 细胞悬浮系统和根培养系统转化情况:在细胞悬浮系统中,与空白对照(鬼臼毒素色谱峰 $t_r=7.617$ min)比较,在保留时间6.4 min 处出现一新峰(图1-B)。在根培养系统中,在6.383、9.083、10.150、11.367、11.983、13.250、14.433、16.083 min 处出现了9个较明显的新色谱峰(图1-C)。可初步说明鬼臼毒素在这两个系统中发生了转化,并且两个系统对鬼臼毒素的转化有明显差异。

根据色谱定量分析结果,在本实验条件下,细胞培养系统使73.8%的鬼臼毒素发生了转化,根培养系统使56.3%的鬼臼毒素发生了转化。

2.3 转化产物的分离鉴定:利用HPLC从细胞悬浮系统中分离得到两个单体gu102和gu103;从根培养系统中分离得到2个单体化合物YL 6和YL 8。根据保留



A-鬼臼毒素对照品 B-细胞悬浮系统 C-根培养系统

A-podophyllotoxin reference substance

B-cell suspension culture system C-root culture system

图1 鬼臼毒素在掌叶大黄培养系统中转化的HPLC色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms of biotransformation of podophyllotoxin in culture systems of *R. palmatum*

时间并结合质谱, gui02 和 YL 8 确定为底物鬼臼毒素。另外初步鉴定了 gui03 和 YL 6 两个转化产物。

2.3.1 化合物 gui03: 白色粉末(甲醇)。EIMS m/z : 414 (M^+ , 100), 396 ($M - H_2O$, 18), 383 (18), 369 (8), 355 (10), 329 (12), 299 (12), 201 (10), 181 (10), 168 (14)。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 2.74 (1H, m, H-3), 3.24 (1H, dd, $J = 5.00, 10$ Hz, H-2), 3.82 (6H, s, 3', 5'-OMe), 3.86 (3H, s, 4'-OMe), 4.11 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, H-1), 4.45 (1H, dd, $J = 6.5, 10$ Hz, H-11 β), 4.52 (2H, m, H-4, H-11 α), 5.96 (2H, d, $J = 11$ Hz, $-OCH_2O-$), 6.38 (1H, s, H-8), 6.45 (1H, s, H-2', 6'), 7.04 (1H, s, H-5)。质谱给出分子离子峰为 414 [M^+], 是基峰, 一系列的碎片离子 396、383、369、355、329、181、168 等符合 4-苯基四氢萘类木脂素的裂解规律, 其中荷质比为 396 的离子峰相对丰度比较高, 表明结构类型有利于脱水反应, 提示该化合物的结构可能为鬼臼苦素, 结合氢谱, 与文献数据基本一致^[11], 由此确定该化合物的结构为鬼臼苦素 (picropodophyllin)。

2.3.2 化合物 YL 6: 无色粉末(甲醇)。EIMS m/z : 414 (M^+ , 100), 396 ($M - H_2O$, 4), 369 (4), 355 (2), 329 (2), 299 (2), 246 (8), 181 (12), 168 (10)。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 2.86 (1H, m, H-3), 3.34 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-1), 3.696 (6H, s, 3', 5'-OMe), 3.70 (3H, s, 4'-OMe), 4.30 (1H, dd, $J = 8.0, 8.5$ Hz, H-11 β), 4.37 (1H, dd, $J = 8.0, 8.5$ Hz, H-11 α), 4.60 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-1), 4.83 (1H, $J = 3.5$ Hz, H-4), 5.94 (2H, d, $J = 3.0$ Hz, $-OCH_2O-$), 6.33 (2H, s, H-2', H-6'), 6.49 (1H, s, H-8), 6.92 (1H, s, H-5)。 ^{13}C -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 40.19 (C-3), 41.75 (C-2), 45.19 (C-1), 56.51 (3', 5'-OMe), 61.04 (4'-OMe), 67.11 (C-4),

69.45 (C-11), 102.78 ($-OCH_2O-$), 109.41 (C-2', 6'), 109.41 (C-5), 110.77 (C-8), 133.01 (C-9), 133.01 (C-10), 133.95 (C-1'), 137.40 (C-4'), 148.65 (C-7), 149.6 (C-6), 153.77 (C-3', 5'), 177.67 (C-13)。

质谱给出分子离子峰为 414 [M^+], 而且一系列的碎片离子 396、369、355、246、181、168 等符合 4-苯基四氢萘的质谱裂解规律, 与鬼臼毒素的质谱比较, 发现该化合物 246 碎片离子的相对丰度明显高于鬼臼毒素, 表明结构中存在有适合脱去取代苯环的结构, 结合质谱, 可以看出, 鬼臼毒素的 $-OH$ 、 $-OMe$ 取代数量无明显变化。提示 4 位的 $-OH$ 取代构型发生改变, 由 α 型改为 β 型, 由此推测该化合物为表鬼臼毒素 (epipodophyllotoxin), 氢谱、碳谱的数据也证实了这个推断, 核磁共振数据与文献报道基本一致^[12]。

3 结论

本实验中加入鬼臼毒素对掌叶大黄细胞悬浮系统和根培养系统的 pH 值无明显影响, 两种掌叶大黄组织培养系统均能转化鬼臼毒素。在本实验条件下, 细胞悬浮系统使 73.8% 的鬼臼毒素发生了转化, 根培养系统中使 56.3% 的鬼臼毒素发生了转化。两种系统对鬼臼毒素的转化产物不同。前者只转化生成鬼臼苦素, 后者转化生成表鬼臼毒素等多种化合物。

利用植物或微生物对一些有活性或结构新颖的化合物进行生物转化, 其实质是某个酶或多酶体系参与的生理生化反应, 与传统的有机合成比较, 有其独特的优势, 由于酶本身的特性, 因此生物转化可以定向、定量地进行, 且后处理容易。

细胞悬浮系统和根培养系统对鬼臼毒素的转化存在差异的原因可能是悬浮细胞与根所处的分化状态不同, 它们的生理状态也不同, 也就是说它们的相关基因是否表达及表达活性强弱不同, 因此, 两个系统中相关酶的种类及数量的多少存在着差异, 所以对同一底物的识别及所起的作用不同。细胞悬浮系统是高度脱分化体系, 系统中酶种类和数量要低于器官水平的根培养系统^[13], 因此导致掌叶大黄根培养系统对鬼臼毒素的转化产物比细胞培养系统复杂。

参考文献

- [1] 谢秀祯, 郭勇. 植物培养物生物转化系统在药物合成上的研究与应用 [J]. 药物生物技术, 2003, 10(6): 405-408.
- [2] Furuya T, A sada Y, Mizobata S, et al. Biotransformation of p-aminobenzoic acid by cultured cells of *Eucalyptus perriniana* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(1): 109.
- [3] 韩健, 戴均贵, 崔亚君, 等. 长春花及银杏植物细胞悬浮培养对青蒿素的生物转化研究 (英文) [J]. 中草药, 2003, 34(2): 116-118.
- [4] 戴均贵, 鲁丹丹, 崔亚君, 等. 桔梗悬浮培养对细胞天麻素的生物转化 [J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(3): 81-89.

- [5] Takayuki S, Toshifumi H. Biotransformation of exogenous substrates by plant cell cultures [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29: 2393.
- [6] 刘长军, 侯嵩生. 抗癌活性物质鬼臼类木脂素的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(3): 81-89.
- [7] Kondo K, Ogura M, Midorikawa Y, et al. Conversion of deoxypodophyllotoxin to podophyllotoxin related compounds by microbes [J]. *Agric Biol Chem*, 1989, 53: 777.
- [8] Kondo K, Ogura M, Midorikawa Y, et al. The conversion of deoxypodophyllotoxin to epipodophyllotoxin by *Penicillium* F-0543 [J]. *Agric Biol Chem*, 1990, 52: 2673.
- [9] Uden W van, Bouma A S, Bracht Waker J F, et al. The production of podophyllotoxin and its 5-methoxy derivative through bio-conversion of cyclodextrin-complexed desoxy-podophyllotoxin by plant cell cultures [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1995, 42: 73.
- [10] Kouman A, Beekman A C, Pras N, et al. The bioconversion process of deoxypodophyllotoxin with *L inum flavum* cell cultures [J]. *Planta Med*, 2003, 69(8): 739.
- [11] Brewer C F, Loike J D, Horwitz S B, et al. Conformational analysis of podophyllotoxin and its congeners. Structure-activity relationship in microtubule assembly [J]. *J Med Chem*, 1979, 22(3): 215.
- [12] Ayres D C, Harris J A. Lignans and related phenols, part XII, application of nuclear magnetic double resonance to aryltetrahydronaphthalene [J]. *J Chem Soc Perkin*, 1972, 1: 1343.
- [13] 杨世海, 刘晓峰, 果德安, 等. 9种活性物质在掌叶大黄组织培养系统中的生物转化 [J]. 吉林农业大学学报, 2005, 27(4): 408-412.

何首乌和夜交藤药材指纹图谱研究与评价

苏 建¹, 袁志芳¹, 吴一兵², 张兰桐^{1*}, 王春英^{1*}

(1. 河北医科大学药学院 药物分析教研室, 河北 石家庄 050017; 2. 河北医科大学药学院 新药开发教研室, 河北 石家庄 050017)

摘 要: 目的 建立何首乌、夜交藤药材指纹图谱分析方法, 并依据指纹图谱对两种药材进行比较, 为科学评价与有效控制何首乌、夜交藤药材质量提供新方法。方法 何首乌和夜交藤分别用甲醇和醋酸乙酯超声处理, 提取液用 HPLC 进行测定。HPLC 法采用 C₁₈ 色谱柱, 乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱, 检测波长分别为 265 和 290 nm, 体积流量 1 mL/min, 柱温 30℃。结果 建立了何首乌、夜交藤药材 HPLC 指纹图谱, 并对不同产地何首乌、夜交藤药材进行了相似度比较。测定结果显示不同产地药材存在较大差异, 化学成分组成及质量分数存在一定差异。结论 所建立的方法简便、可靠, 可用于不同产地何首乌、夜交藤药材的指纹图谱测定和质量评价, 为全面有效控制何首乌药材的内在质量提供了依据。

关键词: 何首乌; 夜交藤; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R 282.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2008)05-0766-04

Fingerprints for Radix Polygoni Multiflori and Caulis et Folium Polygoni Multiflori

SU Jian¹, YUAN Zhi-fang¹, WU Yi-bing², ZHANG Lan-tong¹, WANG Chun-ying¹

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Department of Research and Development of New Drug, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract Objective To establish HPLC fingerprints for *Radix Polygoni Multiflori* and *Caulis et Folium Polygoni Multiflori*, to compare the fingerprints of the above two crude drugs collected from different habitats, and to provide a new method for scientific evaluation and quality control of them.

Methods *Radix Polygoni Multiflori* and *Caulis et Folium Polygoni Multiflori* were extracted by supersonic wave with methanol and ethyl acetate. The chromatographic procedure for fingerprints was carried out using C₁₈ as an analytic column, gradient eluted with a mixture consisting of acetonitrile and 0.1% H₃PO₄. **Results** This experiment established a specific method for the quality control of *Radix Polygoni Multiflori* and *Caulis et Folium Polygoni Multiflori*, and compared the similarity of *Radix Polygoni Multiflori* with *Caulis Polygoni Multiflori* from different habitats. **Conclusion** This method is very simple, reliable, and can be used for the fingerprint assay and quality control of *Radix Polygoni*

* 收稿日期: 2007-09-15

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目: 何首乌降血脂作用的药效物质基础研究(C2006000791)

作者简介: 苏 建(1980—), 男, 河北秦皇岛人, 河北医科大学2004级硕士研究生。

* 通讯作者 张兰桐 Tel: (0311)86266419 Fax: (0311)86052053 E-mail: zhanglantong@263.net