



图2 试管根茎的发芽率

Fig. 2 Gemination rate of rhizome in vitro

研究。

本实验初步探索出射干试管根茎诱导的最佳培养基为MS+ 6-BA 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 白糖6%。发芽率可以达到61.03%。研究数据为今后相关方面的研究和射干工厂化生产育苗提供理论依据。

## 参考文献:

- [1] 姚宗凡, 黄英资, 姚晓敏. 药用植物栽培手册 [M]. 上海: 上海中医药大学出版社, 2001.
- [2] 高文远, 贾伟. 药用植物大规模组织培养 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [3] 刘合刚, 刘国杜. 射干速生高效栽培技术 [J]. 中草药, 2001, 32(8): 749-751.
- [4] 崔翠, 王季春, 何凤发, 等. 光照时间和碳源对试管薯形成的影响 [J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(6): 547-548.
- [5] 史玮, 王蒂. 马铃薯试管薯诱导影响因素的研究 [J]. 甘肃科技, 2007, 23(2): 204-206.
- [6] 白淑霞, 安忠民, 冯学赞, 等. 马铃薯试管薯诱导因子研究 [J]. 中国马铃薯, 2001, 15(5): 271-273.
- [7] 戴黎鸣, 周伟, 陈军峰, 等. 影响大岩桐试管块茎形成的若干因素 [J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2006, 35(5): 71-75.
- [8] 刘玉平, 柯卫东, 黄新芳, 等. 试管芋诱导的研究 [J]. 园艺学报, 2003, 30(1): 43-46.
- [9] 何弈昆, 朱长甫, 何孟元, 等. 半夏小块茎的形态发生及人工种子制作 [J]. 作物学报, 1997, 23(4): 482-485.
- [10] 薛建平, 石乐义, 张爱民. 试管地黄诱导技术的研究 [J]. 中国中药杂志, 2001, 27(11): 824-827.

## 烟草悬浮培养细胞对呋喃囊吾酮的生物转化研究

严春艳<sup>1,2</sup>, 于荣敏<sup>2\*</sup>, 吕华冲<sup>1</sup>, 张德志<sup>1</sup>

(1. 广东药学院药科学院, 广东 广州 510006; 2. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632)

**摘要:** 目的 研究烟草悬浮培养细胞对呋喃囊吾酮(I)的生物转化。方法 将外源底物呋喃囊吾酮乙醇溶液投入预培养10 d的烟草悬浮培养细胞中, 共培养4 d后终止转化, 通过HPLC检测方法, 并利用各种色谱技术分离纯化转化产物, 最后根据其理化性质和光谱数据进行结构鉴定。此外, 实验还考察了共培养时间对转化率的影响。结果 呋喃囊吾酮(I)在烟草细胞中发生了转化, 分离鉴定出两个转化产物: 3-oxo-eremophila-1, 7(11)-dien-12, 8-olide (II)和3-oxo-8-hydroxyeremophila-1, 7(11)-dien-12, 8-olide (III)。转化的最佳共培养时间为5 d, 此时总的摩尔转化率最高(53.1%)。结论 首次利用烟草悬浮培养细胞转化倍半萜类化合物呋喃囊吾酮并获得成功。

关键词: 烟草; 悬浮培养; 生物转化; 呋喃囊吾酮

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)06-0913-04

Biotransformation of furannoligularenone by cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*YAN Chun-yan<sup>1</sup>, YU Rong-min<sup>2</sup>, LÜ Hua-chong<sup>1</sup>, ZHANG De-zhi<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the biotransformation of furannoligularenone by cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. **Methods** Furannoligularenone was added to the medium of the suspension cells of *N. tabacum* after precultured for 10 d, then they were co-cultured for another 4 d. The biotransformed products were detected with HPLC and isolated by various chromatographic methods. The chemical structures of biotransformed products were elucidated on the basis of their physicochemical properties and spectroscopic data. Otherwise, the influence of co-cultured time on conversion ratio was investigated either. **Results** The substrate, furannoligularenone (I), was successfully biotransformed

\* 收稿日期: 2007-09-26

作者简介: 严春艳(1978-), 女, 吉林人, 博士, 研究方向为天然药物活性成分的生物合成与生物转化。E-mail: ycybridge@163.com

\* 通讯作者: 于荣敏 Tel: (020)85220386 E-mail: tym@jnu.edu.cn

by *N. tabacum* cultured cells. Two products, 3-oxo-eremophila-1, 7(11)-dien-12, 8-olide (II) and 3-oxo-8-hydroxyeremophila-1, 7(11)-dien-12, 8-olide (III) were obtained. After co-cultured for 5 d, the mole conversion ratio of the substrate reached the highest (53.1%). **Conclusion** It's the first report on biotransformation of furannoligularenone by *N. tabacum* cultured cells.

**Key words:** *Nicotiana glauca* L.; suspension cultures; biotransformation; furannoligularenone

生物转化(biotransformation),也称生物催化,是指利用植物离体培养细胞、固定化的植物(或微生物)细胞或酶等,对外源底物进行结构修饰而获得更有价值产物的一种技术。植物细胞对底物具有酯化、氧化、羟基化、糖基化、甲基化和乙酰化等多种转化能力。生物转化技术被广泛应用于药物结构修饰、药物代谢研究、新能源开发等领域。利用生物转化手段对底物进行结构修饰,获得一系列化合物,进一步探讨其构效关系,从中找到有新药开发价值的先导化合物及其可能的生物合成途径,有着重要的理论意义和实际应用价值<sup>[1,2]</sup>。

自1973年基因工程诞生以来,烟草*Nicotiana glauca* L.以其易于进行组织培养,容易得到再生的转化植株而成为典型的基因工程模式植物,被誉为植物界的“果蝇”。早在1980年Suga<sup>[3]</sup>研究组就利用烟草细胞对松油醇及其衍生物进行结构修饰,推动了植物生物转化的快速发展。虽然人们利用其他植物体系对生物转化进行了一些研究,但是烟草仍然是国内外学者研究植物生物转化应用最多的培养系统之一。

呋喃囊吾酮(furannoligularenone)属于eremophilane型倍半萜,为菊科囊吾属植物的主要活性成分<sup>[4]</sup>。该属多种药用植物的根及根茎用作中药紫菀的代用品,有很长的药用历史,具有止咳化痰、活血化瘀等功效。本实验首次利用烟草悬浮培养细胞对外源底物呋喃囊吾酮进行了生物转化的研究,以期获得活性转化产物,并对其生物合成的途径进行探讨。

## 1 材料与试剂

1.1 仪器与试剂:雷磁pHS-25数显pH计,上海精密科学仪器有限公司;LDZX-40BI型立式自动压力蒸气灭菌锅,上海申安医疗器械厂;HZQ-QX全温振荡器,哈尔滨东联电子技术开发有限公司;EYELA旋转蒸发仪,上海爱朗仪器有限公司;SGWX-4显微熔点仪,上海精密科学仪器有限公司;Burker Advance 400 MHz核磁共振波谱仪,Burker公司;HPLC:Agilent 1200系列,自动进样器及DAD检测器;色谱柱:Phenomenex C<sub>18</sub> (250 mm ×

4.6 mm, 5 μm),美国菲罗门公司;Sephadex LH-20,Amersham Pharmacia Biotech AB;色谱纯甲醇由江苏汉邦试剂有限公司生产。薄层色谱硅胶,青岛海洋化工厂。

1.2 底物:呋喃囊吾酮,质量分数>98%(HPLC检测)。

1.3 培养体系:培养体系为本实验室利用烟草*N. glauca* L.种子所培养的试管苗,然后经诱导得到愈伤组织,培养数代后得到的烟草悬浮培养细胞系。

## 2 实验方法

2.1 烟草细胞培养体系的建立:以MS+1.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L KT为基本培养基,蔗糖30 g/L,灭菌前pH值调至5.75,分装至250 mL培养瓶中,每瓶100 mL。121 高压灭菌20 min。控制接种量为每100 mL培养基5 g鲜质量烟草细胞,12 d继代一次。25 暗培养,摇床转速110 r/min。悬浮培养连续继代3次后,获得稳定生长的液体培养体系,可用作生物转化实验。

2.2 烟草液体培养细胞生长曲线的绘制:配制液体培养基30瓶,100 mL/瓶,严格控制接种量。从第0天起,每2天取样一次,每次取3瓶。烟草细胞用自来水冲洗3次,55 条件烘干至恒定质量后称取干质量。以培养时间为横坐标,细胞干质量为纵坐标绘制生长曲线。

2.3 生物转化方法<sup>[5]</sup>:烟草细胞在上述培养条件下预培养10 d,精确称取底物(I),乙醇溶解使质量浓度为20 mg/mL,底物溶液无菌注入3瓶培养物中,0.5 mL/瓶,迅速摇匀,同样条件下继续培养4 d。另取3瓶培养物,每瓶加入相同体积的乙醇(不含底物)作为空白对照。

2.4 转化产物的检测<sup>[6]</sup>:底物加入培养物中,共培养一段时间后,抽滤,分别获得烟草培养物和培养基。培养物用蒸馏水冲洗3次,于55 条件下烘干至恒定质量,粉碎成粉末状,称取10 mg粉末置量瓶中,甲醇定容至5 mL,超声提取1 h后,甲醇补足至刻度;培养基定容至100 mL后,取10 mL,-20 保存。将提取液、培养基经0.45 μm微孔滤膜滤过后用于HPLC检测。

同法平行处理对照组培养基和培养物, 进行HPLC检测。

HPLC检测条件: 流动相为45% 甲醇水溶液; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 25℃; 检测波长: 280 nm; 进样量: 10 μL。

2.5 转化产物的分离纯化: 将128 mg 底物(I)加入预培养10 d的烟草细胞培养瓶中, 共培养4 d。抽滤, 分别获得烟草细胞培养物和培养基。培养物用蒸馏水冲洗3次, 55℃条件下烘干至恒质量。培养物用甲醇提取。合并提取液和培养液, 55℃减压蒸干, 得浸膏。上大孔树脂柱初步分离。再经甲醇溶解, 行硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇梯度洗脱; 合并, 减压蒸干。甲醇溶解残渣, 上Sephadex LH-20柱, 甲醇洗脱, 经重结晶, 得转化产物II(5 mg)和III(4 mg)。

2.6 共培养时间对生物转化的影响(*t-C*曲线)<sup>[7]</sup>: 精确控制接种量, 向18瓶预培养了10 d的烟草细胞培养瓶中分别加入20 mg/mL底物乙醇溶液0.5 mL, 培养条件同上。分别在共培养1、2、3、4、5、6 d后取出3瓶终止转化。抽滤获得培养物和培养基, 处理方法同2.4。

### 3 结果

3.1 烟草液体培养细胞生长曲线的绘制: 烟草细胞悬浮培养的生长曲线见图1。在本试验条件下, 细胞培养0~6 d处于延迟生长期, 6~12 d处于对数生长期, 12~18 d处于平台生长期。形态观察发现, 在继代后第10 d左右时烟草细胞生长最旺盛, 细胞分散性好。综合考虑, 烟草细胞最佳的继代周期在12~14 d, 适宜的底物加入时间为8~10 d。

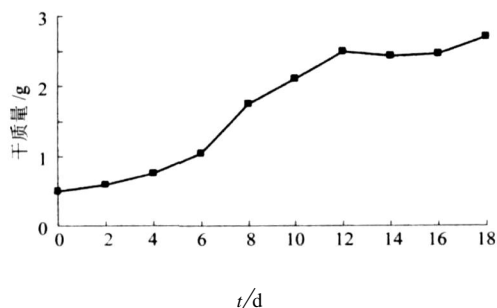
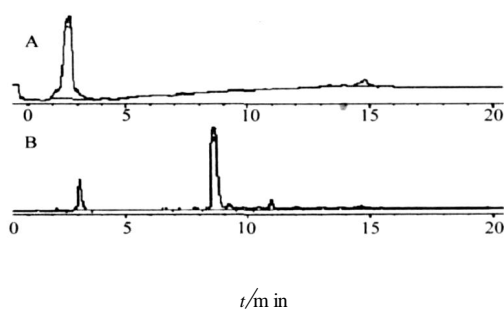


图1 烟草悬浮细胞培养的生长曲线

Fig. 1 Growth curve in cell suspension cultures of *N. tabacum*

3.2 转化产物的HPLC检测: 比较对照组和实验组的HPLC谱图(图2)可看出, 在实验组中存在2个新色谱峰(保留时间为8.6 min和10.9 min), 结合TLC结果可以初步判定该生物转化是成功的。

3.3 产物的结构鉴定: 化合物II: C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>, 无色针晶, mp 184~186℃, <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)



A-MeOH extract of control cultures  
B-MeOH extract of experimental cultures

图2 底物I在烟草细胞中生物转化的HPLC图谱  
Fig. 2 HPLC Chromatogram of biotransformation of substrate I in cells of *N. tabacum*

$\delta$  6.67 (dd,  $J = 10.0, 2.0$  Hz, H-1), 6.00 (dd,  $J = 10.0, 3.2$  Hz, H-2), 2.50 (q,  $J = 6.8$  Hz, H-4), 2.34 (d,  $J = 13.5$  Hz, H-6a), 2.82 (d,  $J = 13.5$  Hz, H-6b), 4.93 (m, H-8), 1.47 (dd,  $J = 12.3, 1.4$  Hz, H-9a), 2.58 (dd,  $J = 13.6, 6.8$  Hz, H-9b), 2.91 (m, H-10), 1.79 (t,  $J = 1.71$  Hz, H-13), 0.62 (s, H-14), 1.12 (d,  $J = 6.8$  Hz, H-15)。<sup>13</sup>C-NMR  $\delta$  151.9 (C-1), 130.2 (C-2), 202.5 (C-3), 44.2 (C-4), 45.0 (C-5), 35.2 (C-6), 161.9 (C-7), 81.5 (C-8), 37.9 (C-9), 55.0 (C-10), 123.6 (C-11), 176.6 (C-12), 8.0 (C-13), 11.5 (C-14), 7.6 (C-15)。参考文献数据<sup>[8]</sup>, 将化合物II鉴定为3-oxo-eremophila-1, 7(11)-dien-12, 8-olide。

化合物III: C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>, 无色针晶, mp 204~206℃, <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)  $\delta$  6.83 (dd,  $J = 10.0, 2.0$  Hz, H-1), 6.15 (dd,  $J = 10.0, 3.3$  Hz, H-2), 2.78 (q,  $J = 6.8$  Hz, H-4), 2.52 (br. d,  $J = 13.2$  Hz, H-6a), 2.86 (d,  $J = 13.1$  Hz, H-6b), 1.89 (t,  $J = 13.4$  Hz, H-9a), 2.54 (dd,  $J = 13.2, 3.4$  Hz, H-9b), 3.24 (br. dd,  $J = 11.5, 1.0$  Hz, H-10), 1.95 (d,  $J = 1.56$  Hz, H-13), 0.78 (s, H-14), 1.27 (d,  $J = 6.86$  Hz, H-15)。<sup>13</sup>C-NMR  $\delta$  152.1 (C-1), 130.0 (C-2), 202.6 (C-3), 44.6 (C-4), 45.6 (C-5), 36.8 (C-6), 169.2 (C-7), 104.7 (C-8), 39.7 (C-9), 55.1 (C-10), 125.4 (C-11), 173.9 (C-12), 8.0 (C-13), 10.9 (C-14), 7.5 (C-15)。参考文献数据<sup>[8]</sup>, 将化合物III鉴定为3-oxo-8-hydroxy-eremophila-1, 7(11)-dien-12, 8-olide。

3.4 转化产物II的时效(*t-C*)曲线: 从图4中可看出, 在培养物中, 产物随着共培养时间的延长而增加, 在5 d时达到最大量(46.3 mg/L)后开始下降;

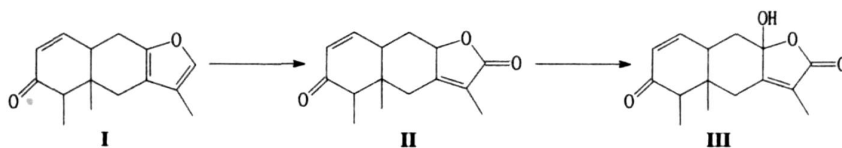


图2 转化产物II和III在烟草细胞中的生物合成途径

Fig. 3 Biosynthesis pathway of compounds II and III in cells of *N. tabacum*

而在培养基中产物先升高, 2 d 达到最高 (1.8 mg/L), 然后缓慢下降。

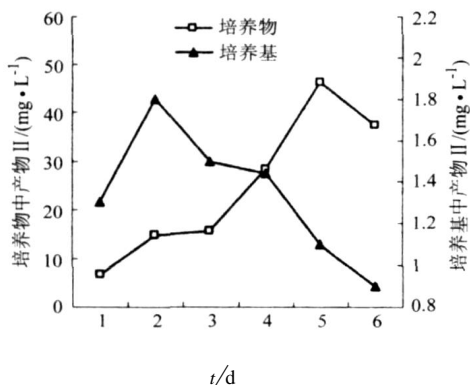


图4 共培养时间对转化产物II在烟草细胞中产量的影响

Fig. 4 Effect of co-culture time on yield of compound II in cells of *N. tabacum*

转化产物III的 *t*-*C* 曲线: 从图5中可以看出, 培养物中, 产物随着共培养时间的延长逐渐增加, 3 d 时升至最高 (62.5 mg/L), 而后逐渐下降; 而在培养基中产物量逐渐上升, 5 d 时量最多 (1.3 mg/L), 而后开始下降。

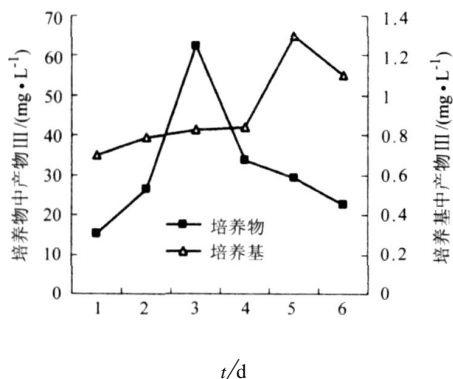


图5 共培养时间对转化产物III在烟草细胞中产量的影响

Fig. 5 Effect of co-culture time on yield of compound III in cells of *N. tabacum*

#### 4 讨论

本研究首次利用烟草悬浮培养细胞对倍半萜类化合物呋喃藜吾酮进行生物转化研究并获得成功。结果表明, 该生物转化系统对底物具有氧化和羟基

化能力。培养的植物体系对外源底物发生羟基化等转化反应是因为底物对其产生了伤害性刺激<sup>[9, 10]</sup>, 进而激活了植物细胞内的相关酶系统, 从而产生生物催化作用, 这被认为是一种减毒过程。目前, 人们普遍认为选择细胞对数生长期的中、早期加入外源底物有利于转化反应的发生, 且对细胞的损伤比较小。实验中预培养 10 d 后加入底物, 因为此时细胞正值对数生长期, 系统的酶活力强, 转化效率高。

实验还表明, 转化产物II和III在培养物和培养基中均有分布, 且以培养物中为主。从产物的时效曲线可以看出若以获得不同的产物为目的, 共培养时间也应不同(产物II为5 d, 产物III为3 d)。若考虑总转化最高, 应共培养5 d, 此时总转化率为53.1%。

#### 参考文献

- [1] 于荣敏. 天然药物活性成分的生物合成与生物转化 [J]. 中草药, 2006, 37(9): 1281-1288.
- [2] Ishihara K, Hamada H, Hirata T, et al. Biotransformation using plant cultured cells [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2003, 23: 145-170.
- [3] Suga T, Aoki T, Hirata T, et al. Transformation of terpenoids with tobacco suspension cells [J]. *Chem Lett*, 1980 (3): 229-230.
- [4] Torres P, Ayala J, Grande C, et al. Furanoreophilic derivatives from *Senecio flavus* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52: 1507-1513.
- [5] 严春艳, 张章, 于荣敏, 等. 何首乌毛状根生物转化对苯二酚生产熊果苷的研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(3): 192-195.
- [6] Yan C Y, Yu R M, Zhang Z, et al. Biotransformation of 4-hydroxybenzen derivatives by hairy root cultures of *Polygonum multiflorum* Thunb. [J]. *J Integr Plant Biol*, 2007, 49 (2): 207-212.
- [7] 张章, 陈敏青, 任盛芳, 等. 转基因西洋参冠瘿组织生物合成熊果苷的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(5): 759-761.
- [8] 张朝凤, 张勉, 屈蓉, 等. 侧茎藜吾的倍半萜类成分研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(6): 341-343.
- [9] 于荣敏, 赵显. 现代生物技术方法在中药现代化中的应用 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
- [10] Giri A, Dhingra V, Giri C C, et al. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: Current trends and future prospects [J]. *Biotechnol Adv*, 2001, 19: 175-199.