

萝芙木属植物药理活性和单萜吲哚生物碱合成途径研究进展

陈晓英, 郭晓云, 李 翠, 李 莹, 姚绍嫦, 张占江, 蓝祖裁*

广西壮族自治区药用植物园 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530023

摘 要: 萝芙木属植物中的蛇根木是印度传统草药, 目前萝芙木属植物成为中国常用南药, 主要用于治疗高血压、精神类疾病、心血管疾病、癌症等。对国产萝芙木属植物资源种类及分布、药理活性、萝芙木单萜吲哚生物碱的合成途径等研究进展进行综述, 为萝芙木属植物的研究和临床应用提供参考。

关键词: 萝芙木属; 蛇根木; 单萜吲哚生物碱; 生物合成途径; 关键酶

中图分类号: R282.71 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)08-2004-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.08.035

Research progress on pharmacological properties and monoterpenoid indole alkaloids biosynthetic pathway in plants of genus *Rauvolfia*

CHEN Xiao-ying, GUO Xiao-yun, LI Cui, LI Ying, YAO Shao-chang, ZHANG Zhan-jiang, LAN Zu-zai

Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China

Abstract: *Rauvolfia serpentina* is a traditional Indian medicine and now the genus *Rauvolfia* becomes a commonly used south medicine in China. *Rauvolfia* is mainly used to treat hypertension, mental illness, cardiovascular disorders, cancer, and other diseases. The paper overviewed the main species and distribution, pharmacological properties, and the monoterpenoid indole alkaloids biosynthetic pathway of *Rauvolfia* in China. The paper aims to provide reference for research and clinical application in plants of the genus *Rauvolfia*.

Key words: *Rauvolfia* Linn.; *Rauvolfia serpentina* (Linn.) Benth. ex Kurz.; monoterpenoid indole alkaloids; biosynthetic pathways; key enzymes

萝芙木属 *Rauvolfia* Linn. 植物在中国历代本草和医学书籍中未见记载, 其药用价值记载最早见于印度古药方手册《遮罗迦本集》, 如利用萝芙木属的蛇根木 *Rauvolfia serpentina* (Linn.) Benth. ex Kurz. 治疗发热、蛇咬、精神类疾病等^[1], 印度也是最早发现蛇根木生物碱有镇静和降血压作用的国家^[2]。我国自 20 世纪 50 年代起开始开发国产萝芙木属药材资源, 并在 1958 年用萝芙木总碱生产出降压药降压灵 (Verticil), 疗效好于印度进口的寿比南 (Serpina)。现在萝芙木属植物已是我国常用南药之一。本文对国产萝芙木属植物资源种类及分布、药理活性、萝芙木单萜吲哚生物碱的合成途径等研究进展进行综述, 为萝芙木属植物的研究和临床应用

提供参考。

1 资源种类及分布

萝芙木为夹竹桃科萝芙木属植物的总称。萝芙木属植物多分布于中国、印度、越南等地的热带和亚热带地区。《中国植物志》1977 年版第 63 卷中列出了萝芙木属的 12 种植物 (表 1), 其中包括萝芙木的 1 个原变种和 3 个变种: 萝芙木 (原变种)、药用萝芙木、倒披针叶萝芙木、海南萝芙木。此外, 萝芙木还有 1 个常见的变种是红果萝芙木, 也有文献认为红果萝芙木只是 1 个变型 *R. verticillata* (Lour.) Baill. f. *rubrocarpa* H. T. Chang. mss.^[3-6]。而《中国植物志》1995 年英文修订版则只列出了 7 种萝芙木属植物: 四叶萝芙木、蛇根木、古巴萝芙木、

收稿日期: 2019-01-14

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目 (桂科攻 0424008-1J); 广西科技计划项目 (桂科 AD17292004); 北京市计算中心云计算关键技术与应用北京市重点实验室课题: 药用植物资源信息化在防伪溯源中的应用研究

作者简介: 陈晓英, 女, 博士, 副研究员, 主要从事药用植物生理生态研究。Tel/Fax: (0771)5602850 E-mail: chxying2016@sina.com

***通信作者** 蓝祖裁, 男, 副主任技师, 主要从事药用植物栽培研究。Tel/Fax: (0771)2443582 E-mail: zuzai@126.com

表 1 中国萝芙木主要种类及分布

Table 1 Main species and distribution of *Rauvolfia* in China

序号	植物名	产地与分布
1	四叶萝芙木（异叶萝芙木） <i>R. tetraphylla</i> Linn.	原产南美洲，西双版纳栽培，广东、广西也有引种
2	蛇根木（印度萝芙木） <i>R. serpentina</i> (Linn.) Benth. ex Kurz	生于山地林中，云南耿马、景洪野生，西双版纳、昆明等地有栽培，广东、广西也有栽培
3	古巴萝芙木 <i>R. cubana</i> A. DC.	原产古巴，西双版纳栽培
4	催吐萝芙木 <i>R. vomitoria</i> Afzel. ex Spreng.	原产热带非洲，广东、广西、云南有栽培
5	吊罗山萝芙木 <i>R. tiaolushanensis</i> Tsiang	产于广东海南，生于山地林中
6	霹雳萝芙木 <i>R. perakensis</i> King et Gamble	原产于马来西亚和泰国，云南临沧、昆明、耿马、西双版纳等地栽培，广东海南也有栽培
7	台湾萝芙木 <i>R. taiwanensis</i> Tsiang	产于我国台湾省，生于山地林中
8	矮青木 <i>R. brevistyla</i> Tsiang	产于广东南部，生于林荫下
9	萝芙木 <i>R. verticillata</i> (Lour.) Baill.	分布于广东、广西、云南、海南、台湾等地
9a	萝芙木（原变种） <i>R. verticillata</i> (Lour.) Baill. var. <i>verticillata</i>	分布于我国西南、华南、台湾等省区及越南等地，一般生于林边、丘陵地带的林中或溪边较潮湿灌木丛中
9b	药用萝芙木 <i>R. verticillata</i> (Lour.) Baill. var. <i>officinalis</i> Tsiang	产于广西西南部，生于海拔 500~800 m 山地沟谷较潮湿地方
9c	倒披针叶萝芙木 <i>R. verticillata</i> (Lour.) Baill. var. <i>oblanceolata</i> Tsiang	产于云南南部的景东、西双版纳等地，生于海拔 1 550 m 山地丛林中
9d	海南萝芙木 <i>R. verticillata</i> (Lour.) Baill. var. <i>hainanensis</i> Tsiang	产于广东和广西，生于低海拔山地沟谷荫湿地方
9e	红果萝芙木 <i>R. verticillata</i> (Lour.) Baill. var. <i>rubrocarpa</i> Tsiang	产于广西、海南
10	云南萝芙木 <i>R. yunnanensis</i> Tsiang	产于景洪、勐海、西双版纳、思茅、西畴、屏边等地，贵州和广西也有分布，生于海拔 900~1 300 m 山地灌木丛中或山地密林荫处及溪旁湿润肥沃地方
11	风湿木（阔叶/大叶萝芙木） <i>R. latifrons</i> Tsiang	产于广西西南部，现广东南部有栽培，生于海拔 300~800 m 山地丘陵山谷林中或路旁灌丛中，分布于我国台湾省及西南、华南等地
12	苏门答腊萝芙木 <i>R. sumatrana</i> Jack	原产于印度尼西亚、马来西亚，中国广东南部栽培

催吐萝芙木、吊罗山萝芙木、萝芙木、苏门答腊萝芙木。英国皇家植物园邱园（Royal Botanic Gardens, Kew）和美国密苏里植物园（Missouri Botanical Garden）联合编制的 *The Plant List* (<http://www.theplantlist.org>) 收录认可的萝芙木属植物有 242 种，包括了《中国植物志》中除红果萝芙木外的其余萝芙木属物种；然而，国际植物园保护联盟（Botanic Gardens Conservation International, BGCI, http://www.bgci.org/plant_search.php）认可的萝芙木属 18 个种中只包括了《中国植物志》中记载的 5 种，即四叶萝芙木、蛇根木、古巴萝芙木、催吐萝芙木、

苏门答腊萝芙木；此外，美国农业部自然资源保护服务（USDA-Natural Resources Conservation Service, NRCS）的植物数据库（PLANTS Database, <https://plants.sc.egov.usda.gov>）收录的 20 种萝芙木属植物中，也只包括了《中国植物志》中记载的 3 种，即四叶萝芙木、蛇根木、催吐萝芙木^[3]。

我国萝芙木属植物多分布在广东、广西、云南、海南等省，其中广西境内有 9 种，即四叶萝芙木、蛇根木、催吐萝芙木、萝芙木（原变种）、药用萝芙木、海南萝芙木、云南萝芙木、风湿木/阔叶萝芙木、红果萝芙木^[7]。

目前主要认为四叶萝芙木、蛇根木、催吐萝芙木、萝芙木、云南萝芙木有药用价值^[3]，但后来发现吊罗山萝芙木、霹雳萝芙木、倒披针叶萝芙木、海南萝芙木、阔叶萝芙木的根中也有生物碱活性成分，萝芙木的药用价值逐渐被挖掘。

2 药理活性

萝芙木属植物的药理活性研究最初以利血平(reserpine)的降压作用和阿吗灵(ajmaline)的抗心律失常作用为主^[1,2,8-10]，但二者的毒性和不良反应较多^[11-13]。目前的研究重点一方面是根据萝芙木已知的化学成分及药理活性开发新药以替代有副作用的传统药物^[14]，或研究其作用机制^[15]；另一方面是探寻萝芙木对癌症、人类免疫缺陷病毒(HIV)、糖尿病等重大疾病的防治作用^[16-19]，研究物种以蛇根木和催吐萝芙木为主。

2.1 抗精神障碍类疾病活性

与常见的治疗精神分裂症、躁郁症等精神类疾病的药物氯丙嗪(chlorpromazine)相比，催吐萝芙木根皮提取物能够减少小鼠运动失调，不改变其探索行为，且只在高剂量时才可降低小鼠的自主运动行为。其中的活性成分鸡骨常山碱(alstonine)既能显著缓解焦虑，也不像常规抗精神病药物那样引起惊厥反应，表明其在精神类疾病治疗方面有很大的应用潜力^[20-21]。

研究还发现，催吐萝芙木根皮中皂苷成分(三萜皂苷为主)比生物碱成分(利血平为主)有更好的抗抑郁效果。通过比较正常 CD1 小鼠及莨菪碱诱导的记忆损伤 CD1 小鼠经生物碱、皂苷处理后的筑巢行为得分、悬尾实验和强迫游泳实验中出现不动行为的潜伏期和不动时间、排便频率，分析小鼠的社交行为和抑郁倾向。结果表明生物碱处理能导致小鼠抑郁，而皂苷处理能抗抑郁，而且这 2 种成分对记忆损伤小鼠的抑郁行为分别具有加剧和缓解的作用。催吐萝芙木根皮中皂苷类成分的这种显著抗抑郁作用值得关注，有望开发成新药^[22]。

在非洲的加纳共和国，催吐萝芙木为常用的止痛、抗焦虑、抗痉挛、镇静、抗抑郁等精神类疾病的药用植物，通常将其根煎煮后滴鼻使用^[23]；而且作为一种低廉易得的传统和替代药物，催吐萝芙木低毒并具有多种药理活性，能够缓解发展中国家药物短缺的问题^[23-24]。

2.2 抗寄生虫活性

针对血吸虫病的治疗目前只有一种驱虫药物吡

喹酮(praziquantel)，而且其只对成虫有效，因此有必要研发安全有效的抗血吸虫药物。研究发现催吐萝芙木茎皮和根的乙醇提取物能在体外有效杀死曼血吸虫 *Schistosomiasis mansoni* Sambon 的尾蚴和成虫。在培养 2 h 后，萝芙木茎皮提取物对尾蚴的最小致死浓度为 62.5 $\mu\text{g/mL}$ ，最小有效浓度为 31.25 $\mu\text{g/mL}$ ，而根提取物对尾蚴的最小致死浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ ，最小有效浓度为 125 $\mu\text{g/mL}$ ，表明茎皮提取物的作用效果好于根提取物。2 种提取物对不同生长阶段的血吸虫均有效，且体外毒性实验表明其细胞毒性较低。这些结果表明催吐萝芙木茎皮和根提取物是潜在的抗血吸虫药物^[25]。

盘尾丝虫 *Onchocerca volvulus* Bickel 病能够致盲，而盘尾丝虫对唯一的治疗药物伊佛霉素(ivermectin)已产生了抗性，需要开发新药。实验表明催吐萝芙木的有机溶剂(80%乙醇、正己烷、氯仿、醋酸乙酯)提取物在体外均有抗丝虫病活性，能够使活动的盘尾丝虫僵化不动，抑制程度呈浓度和时间依赖性，而且不同提取液在不同时间的 IC_{50} 也不同，在作用 48 h 时除醋酸乙酯外其余提取物的半数抑制浓度(IC_{50})均低于 6.25 $\mu\text{g/mL}$ ^[26]。

2.3 抗糖尿病活性

Pathania 等^[27]编制了蛇根木结构数据库 Serpentina DB (<http://home.iitj.ac.in/~bagler/webserver/SerpentinaDB/>)，并利用该数据库从萝芙木提取物中筛选得到了糖代谢通路中关键限速酶醛糖还原酶(aldose reductase)的有效抑制剂 indobine，可作为治疗糖尿病及其并发症的候选活性化合物。

蛇根木的甲醇提取物既能治疗糖尿病又能对心脏起到保护作用。饮用催吐萝芙木叶和酸橙 *Citrus aurantium* Linn. 果实煎煮的茶叶 4 个月，2 型糖尿病患者餐后血糖、糖基化血红蛋白、空腹血糖水平降低，高、低密度脂蛋白水平降低但二者比值不变，肌纤维中脂肪酸总量无显著变化，但脂肪酸组成中饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸水平降低，多不饱和脂肪酸水平上升，而且未出现明显的副作用^[28]。

研究发现，蛇根木根的水-甲醇提取物对 ip 150 mg/kg 四氧嘧啶诱导的 1 型糖尿病雄性白化小鼠有很好的降糖和调脂作用。该提取物 50、100、150 mg/kg 处理的糖尿病小鼠体质量增加，空腹血糖水平显著降低，血清胰岛素水平显著升高；同时三酰甘油、总胆固醇、低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白水平降低而高密度脂蛋白水平升高；而且作用具有

剂量依赖性,在高剂量(150 mg/kg)时,其降糖调脂的效果略优于格列本脲 5 mg/kg。蛇根木的这种降糖调脂作用能够降低 1 型糖尿病小鼠患冠心病的风险^[29]。

2.4 抗癌活性

萝芙木生物碱具有抗肿瘤活性。早在 1950 年即发现了利血平的体内抗癌活性,能抑制小鼠肿瘤细胞的增殖,但由于其较高的毒性而没有被用作抗癌药物。后来的研究发现利血平对于既有高血压又有癌症的患者来说可能是很好的癌症化疗制剂^[15]。另外,在催吐萝芙木的生物碱中发现的鸡骨常山碱具有抗前列腺癌的活性^[16]。

催吐萝芙木根皮提取物在去除其中的利血平成分后,主要富含 β -咔啉(β -carboline)类生物碱。体外研究发现该提取物对多种胰腺癌细胞都具有细胞毒活性,IC₅₀ 为 83~283 μ g/mL,而对正常人胚肺成纤维细胞 MRC-5 毒性很低(IC₅₀ 为 553 μ g/mL); 400 μ g/mL 的提取物能完全抑制胰腺癌 PANC-1 细胞在软琼脂中的集落形成,也能使 94% 的癌细胞凋亡。该提取物还能增强传统的抗胰腺癌化疗药吉西他滨的作用效果,二者合用能降低达到同样细胞毒性所需的吉西他滨的量。体内研究发现该提取物 20、50 mg/kg 对肿瘤生长有明显的抑制作用,能减少原位移植胰腺癌的肿瘤负荷和肿瘤质量,抑制肿瘤转移,加速肿瘤细胞凋亡,对肝脾肾均无损伤^[30]。进一步研究发现催吐萝芙木根皮提取物在体外和体内均能优先抑制胰腺癌的肿瘤干细胞,从而抑制肿瘤发生和转移,降低药物耐受性^[31]。有研究指出催吐萝芙木根皮中 β -咔啉类生物碱抗胰腺癌的主要成分是鸡骨常山碱,鸡骨常山碱还具有抗前列腺癌的活性^[17]。

2.5 抗 HIV 活性

HIV 为逆转录病毒,能够有效抑制 HIV 复制的鸡尾酒疗法无法完全清除 HIV,而且长期持续用药会导致耐药性增加,也会产生胃肠道反应、皮疹、骨髓抑制、脂肪重分布、脂类和糖类代谢异常等多种毒副作用,需要开发新的安全低毒且价格低廉的抗 HIV 药物或疗法^[32]。

蛇根木中含有的生物碱结构与抗 HIV 的生物碱如两面针碱(nitidine)、bucapine、吗啡(morphine)等结构相似,且在传统印度医药中也常用于免疫调节,符合用于筛选抗 HIV 药物的条件。研究发现蛇根木根的甲醇提取物在质量浓度为 10 μ g/mL 时对

HIV-1NL4.3 的抑制率可达到 40.8%,有望成为安全廉价的抗 HIV 药物^[19]。不过,目前萝芙木属植物抗 HIV 活性的研究还很少深入到药理和病理。

2.6 抗菌及抗氧化活性

萝芙木根的乙醇提取物能够抑制克雷伯肺炎杆菌 *Klebsiella pneumoniae*、葡萄球菌 *Staphylococcus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 等的感染,亚铁还原能力实验也表明该提取物有较高的抗氧化能力^[9],这种强的抗氧化活性与萝芙木中含有大量的可以清除自由基和活性氧的酚类、黄酮类、生育酚等活性成分有关^[9-10,18]。

野生蛇根木根甲醇提取物在 0.15~0.45 μ g/mL 时对 DPPH·自由基清除率高于同质量浓度的抗坏血酸,IC₅₀ 为 0.20 μ g/mL,表明蛇根木有较好的抗氧化活性^[33]。蛇根木根的甲醇提取物除了在体外具有清除 DPPH·自由基和保护质粒 DNA 免受 H₂O₂ 伤害的抗氧化活性外,体内实验也表明其与大蒜 *Allium sativum* L.、阿江榄仁 *Terminalia arjuna* (Roxb. ex DC.) Wight & Arn.、锐刺山楂 *Crataegus oxyacantha* L.、芫荽 *Coriandrum sativum* L. 的抗氧化中药组合对结扎冠状动脉左前降支诱导急性心肌梗死模型的犬具有心脏保护作用,这种抗氧化活性被认为与其含有的育亨宾、阿吗灵、蛇根碱等生物碱有关^[34]。

2.7 冷冻保护作用

从蛇根木中提取的一种果胶多糖 rauwolfian 在低温下(-20、-40、-80 $^{\circ}$ C)能够减少白细胞损伤、增加白细胞完整度、增加中性粒细胞的数量并维持吞噬活性等,推测可能是其多糖侧链含有的大量羟基起到了冷冻保护作用^[35]。Khudyakov 等^[36]进一步研究了 rauwolfian 在水-冰晶相变过程中所起的作用,认为这种冷冻保护作用是由 rauwolfian 的结构特性决定的,尤其是侧链分枝化程度和中性单糖分子的质量和数量。不过这种冷冻保护作用的研究目前还是以白细胞的超低温保存为主。

3 毒性

利血平比较显著的副作用有致抑郁、强直性痉挛、运动障碍、认知障碍等,常利用利血平诱导制备啮齿类动物的抑郁症^[37]、迟发性运动障碍^[38]、帕金森症^[39-40]等疾病模型。利血平还能引发大鼠和小鼠的乳腺癌和胃癌^[41],这些副作用与剂量高低及长期服用有关。

尽管蛇根木被美国国立卫生研究院列为 7 种成

人膳食补充剂之一，但是蛇根木对人的安全剂量未知。体外研究发现，蛇根木根的甲醇提取物能促进人近端肾小管上皮 HK-2 细胞活性氧产生，损伤其线粒体功能，导致肾损伤；这种肾毒性具有剂量效应，在 200 $\mu\text{g/mL}$ 时几乎使 HK-2 细胞全部死亡。蛇根木对肝脏的影响也有待评估^[42]。

治疗阿片戒断症状的患者在误服蛇根木粉后致死,其血液和胆汁中都检测到阿吗灵、育亨宾、利血平,推测可能是这3个生物碱对心脑血管造成的影响和药物戒断反应一起共同导致了患者的死亡^[1]。

总之, 萝芙木属植物既有多种药用价值, 也有

不可忽视的毒性效应，是一把双刃剑，对其使用也要视具体情况而定。

4 萝芙木单萜吲哚生物碱合成途径

4.1 单萜吲哚类生物碱合成途径中关键酶及其相关基因的研究

萝芙木属单萜吲哚类生物碱 (monoterpenoid indole alkaloids, MIA) 合成途径中研究较为透彻的是蛇根木中阿吗灵的生物合成途径。阿吗灵生物合成途径包括主链反应和支链反应, 主要涉及 7 个关键酶 (图 1)。

4.1.1 异胡豆苷合成酶 (strictosidine synthetase,

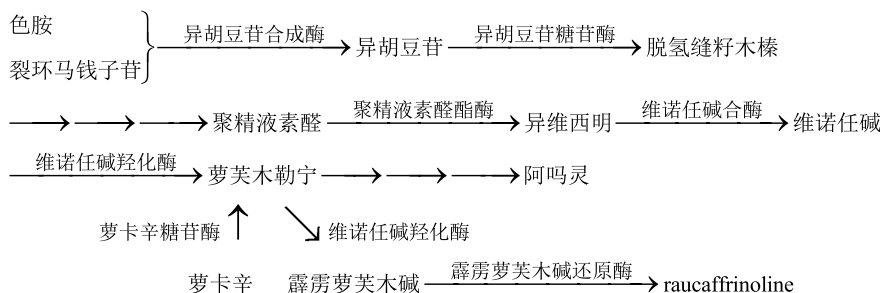


图 1 阿吗灵生物合成途径及其中的 7 个关键酶

Fig. 1 Biosynthetic pathway of ajmaline and seven key enzymes

STR1, EC 4.3.3.2) 色胺 (tryptamine) 在 STR1 的催化下通过 Pictet Spengler-type 反应与裂环马钱子苷 (secologanin) 缩合生成异胡豆苷 [3 α (S)-strictosidine]。异胡豆苷是目前从高等植物中分离得到的 2 000 多种单萜吲哚类生物碱的普遍前体化合物和中心化合物^[43-46], 可再经不同分支酶催化生成多种生物碱如利血平、文多灵 (vindoline)、喜树碱 (camptothecin)、长春碱 (vinblastine)、奎宁 (quinine) 等^[44]。STR1 是萜类吲哚生物碱次生代谢合成途径中关键的限速酶, STR1 基因的过表达能提高生物碱水平^[44-46]。STR 家族中目前只鉴定出了 STR1^[44], 其活性中心特异性的催化位点是 Glu309^[44]。

4.1.2 异胡豆苷糖苷酶 (strictosidine glucosidase, SG, EC 3.2.1.105) 异胡豆苷在 SG 的作用下脱去糖基形成 1 个开环、不稳定的糖苷配体 (aglycone), 该配体可进一步形成大量吲哚和喹啉类生物碱结构的衍生物, 主要存在于夹竹桃科 (Apocynaceae)、茜草科 (Rubiaceae)、马钱科 (Loganiaceae) 植物中^[43,46-47]。SG 活性中心特异性的催化位点是 Trp388^[43]。

4.1.3 聚精液素醛酯酶 (polyneuridine aldehyde

esterase, PNAE, EC 3.1.1.78) 聚精液素醛 (polyneuridine aldehyde, PNA) 是阿吗灵合成途径中的第 1 个生物碱, 具有 C-10 单元的 sarpagan 结构。PNA 经 PNAE 的酯水解作用生成聚精液素醛酸, 再自发脱羧形成具有 C-9 单元 ajamlan 骨架的异维西明 (16-*epi*-vellosimine)。异维西明是合成阿吗灵型生物碱的前体, 异维西明异构化形成的维西明是合成蛇根精型生物碱的前体, 故此步反应是阿吗灵型生物碱和蛇根精型生物碱生物合成的分叉点, 这也决定了 PNAE 是阿吗灵生物合成的关键位点, 控制下游生物碱的合成方向, PNAE 的反应速率对阿吗灵的合成代谢起了关键的调控作用^[45-46]。PNAE 属于 α/β 水解酶超家族, 具有高度的底物特异性^[46]。

4.1.4 维诺任碱合酶 (vinorine synthase, VS, EC 2.3.1.160) 具有蛇根精骨架的异维西明经依赖于乙酰辅酶 A 的 VS 催化生成具有阿吗灵骨架的维诺任碱 (vinorine), 是阿吗灵生物合成途径中最后 1 个闭环反应, 是蛇根精型和阿吗灵型生物碱合成代谢中的关键酶, 属于酰基转移酶 BAHD 超家族^[45-48]。

4.1.5 萝卡辛糖苷酶(raucaffricine glucosidase, RG, EC 3.2.1.125)

RG 催化阿吗灵生物合成途径中的

一个重要支链反应, 萝卡辛 (raucaffricine) 在 RG 作用下脱糖基生成阿吗灵生物合成途径主链上的中间产物萝芙木勒宁 (vomilenine)。萝芙木勒宁再经水解和吡啶氮位甲基化的 2 步还原生成最终产物阿吗灵^[43,45-47]。RG 与 SG 一样同为 β -葡萄糖苷酶, 但 RG 的底物特异性小于 SG, RG 活性中心特异性的催化位点是 Trp392, 是区分底物是萝卡辛还是异胡豆苷的关键, 其邻近的 Ser390 位点导致 Trp392 发生构象变化从而形成了植物中典型的葡萄糖苷酶构象^[46]。

4.1.6 霹雳萝芙木碱还原酶 (perakine reductase, PR, EC 1.1.1.317) PR 催化阿吗灵生物合成途径中的重要支链反应, 具毒性的醛类生物碱霹雳萝芙木碱 (perakine) 在有 NADPH 辅酶时经 PR 催化还原为醇类生物碱 raucaffrinoline^[49-50]。PR 属于醛酮还原酶 (aldo-keto reductase, AKR) 超家族, 其序列中含有 AKR 特征性的四分体功能性氨基酸 (Asp52、Tyr57、Lys84、His126)^[50]。

4.1.7 维诺任碱羟化酶 (vinorine hydroxylase, VH, EC 1.14.13.75) Dang 等^[51]分析了蛇根木阿吗灵生物合成途径中 VH, 认为这是一种细胞色素 P450 酶且具有双重催化特性, 不仅将维诺任碱羟化生成萝芙木勒宁, 而且将萝芙木勒宁非氧化异构成霹雳萝芙木碱, 故可用来控制生物碱合成途径的分支反应。目前, 这 7 个关键酶是蛇根木阿吗灵生物合成途径中研究的热点, 它们在生物合成途径中的位置见图 1。这些酶也是药用植物代谢工程的候选靶点, 比如最常用的 STR 基因, 其表达水平与 MIA 的量直接相关^[52]。

萝芙木 MIA 合成途径中关键酶及其相关基因的研究多集中在克隆和得到基因全长、相关的生物信息学分析、组织定位、体外异源表达蛋白、纯化、定点突变、结晶、酶与底物或辅因子复合物三维结构表征、活性位点构造、底物特异性及抑制剂作用机制、转基因以调控活性成分积累及研究活性成分在植物体内的时空表达特性等方面^[43-50,52-53]。这些研究对进一步开发利用该药用植物、研究系统发育与进化、应用酶修饰对酶进行改造、调控生物代谢方向、合成新的有药用价值的化合物等具有重要意义^[44,52-53]。

4.2 单萜吡啶类生物碱合成途径中转录因子和转录组的研究

在与萝芙木有相同 MIA 合成途径的长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 中发现, STR 的启

动子区域有 1 个短序列的响应元件 JERE (jasmonate and elicitor-responsive element), 在茉莉酸诱导时, 转录因子 ORCA2 和 ORCA3 都能分别与 JERE 相互作用, 激活 STR 基因的表达; 因 ORCA3 能调控多种基因的表达, 故被认为在萜类吡啶生物合成中起核心调控作用。其他的转录因子如 CrBPF1 在诱导子存在时也能与 JERE 相互作用从而激活 STR 基因的表达; 在 STR 启动子区有 1 个临近 JERE 的顺式作用元件 G-box, 转录因子 CrGBF1 和 CrGBF2 能与 G-box 结合抑制 STR 的基因表达, 另 1 个转录因子 CrMYC2 也能与 STR 的 G-box 结合, 茉莉酸能诱导 CrMYC2 的表达, 但 CrMYC2 对 STR 基因表达的作用未知^[54]。在长春花中还发现一类锌指蛋白转录因子 ZCT, 可以结合在 STR 启动子的不同区域, 也能抑制 ORCAs 蛋白对 STR 启动子的激活, 从而抑制 MIA 的积累^[55]。Prakash 等^[56]通过计算机模拟分析从蛇根木已知核苷酸库中筛选鉴定出了 15 个微 RNA (microRNAs, miRNAs), 预测了其调控的转录因子和靶基因, miRNAs 能调控植物生长发育的多种生物学过程, 尤其是对能产生高药用价值的生物碱和花青素等的次生代谢合成途径有调控作用, 可作为一种代谢工程工具调控药用植物中次生代谢物的生物合成。

目前还没有萝芙木的基因组、蛋白质组、代谢组的信息, 萝芙木的转录组分析仍然以蛇根木为模式生物。Góngora-Castillo 等^[57]经过大规模转录组测序和从头组装, 鉴定出了蛇根木的 99 637 个转录本, 其中有 41 405 个 unigene; 功能注释比对分析表明大约有 83.9%、84.5%、81.8% 的蛇根木转录组序列与 UniRef100 数据库、Pfam 结构域数据库、拟南芥蛋白组数据库类似, 同时对 13 639 个代表性转录本进行 GO Slim 术语分析, 在分子功能、生物学过程、细胞组分方面得到与拟南芥全蛋白质组相似的分类类群; 此次转录组分析还检测到了 Genbank 中蛇根木的全部 74 个核苷酸多肽序列, 而且大部分是全长或近全长序列; 聚类分析表明处在不同发育时期的同一组织 (如木质化的茎、上部的茎、色素化了的茎) 基因表达丰度相近; 转录组数据的质量用已知基因的表达进行检测, 结果表明蛇根木 MIA 生物合成途径中的几个关键酶 (如 STR、SG、VS、RG、PR 等) 的基因在花、叶、茎中的表达模式一致。转录组分析不仅提供了可供有效克隆和表达的基因全长序列, 对今后进一步挖掘和鉴定 MIA 代谢途径的

其他未知基因也提供了研究思路和可行性。

Corbin 等^[58]建立了蛇根木、四叶萝芙木的烟草脆裂病毒载体 (tobacco rattle virus vectors) 介导的八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene desaturase) 基因沉默技术, 八氢番茄红素脱氢酶是影响类胡萝卜素合成的限速酶之一, 该基因沉默导致的叶片光漂白可用于检测基因沉默的效率, 这种用基因枪将病毒载体导入植物的基因沉默技术可用于识别和表征萝芙木属单萜吲哚生物碱合成过程中的基因。

5 结语与展望

萝芙木属植物药用历史悠久, 国际上对萝芙木药理活性的研究目前仍以新药开发尤其是重病防治为主, 除了进一步对传统的蛇根木加以开发利用外, 催吐萝芙木在治疗精神类疾病、抗血吸虫、抗丝虫病、抗癌、抗糖尿病等方面展现了潜力, 也使得催吐萝芙木成为了继蛇根木之后的研究热点, 但这些研究还是以科研为主, 少见有上市的药品; 此外, 对单萜吲哚类生物碱合成途径中关键酶及其相关基因的研究, 仍以蛇根木中阿吗灵的生物合成途径为主, 且偏重酶学分析, 基因功能和表达调控方面的研究较少。总体来说, 除了要加强萝芙木的新药研发和临床应用外, 借鉴长春花的基因组和相关 MIA 生物合成途径的研究成果^[59], 进一步研究关键酶和基因的功能, 阐明基因表达调控网络, 以更好地调控药用有效成分的合成可能是未来研究的重点。

在中国, 相比丹参、三七、灵芝、重楼、甘草、金银花等传统中药, 萝芙木不属于名优药材, 国内对萝芙木的研究还处在初级阶段, 目前仍多集中在开发利用萝芙木资源、分离鉴定活性成分、传统的药理活性分析、栽培种植管理等方面, 对于药理活性研究中的新药研发和重病防治等领域还很少涉及, 也没有明确和系统的有效成分结构和分类信息数据; 对于 MIA 生物合成途径, 除了酶学研究上有部分进展外, 也很少涉及到转录因子调控、基因组、转录组等方面的内容; 研究的物种也以本国产的云南萝芙木、海南萝芙木、红果萝芙木等为主, 对国际上常用的蛇根木和催吐萝芙木的药用价值开发研究不够; 这些问题都将是未来我国萝芙木研究的重点。对萝芙木研究需要加强现代生物技术的应用, 拓展和加深研究内容, 以促进萝芙木市场和医药行业的发展。

志谢: 凌征柱教授给予本文指导。

参考文献

- [1] Singh M, Kaur R, Rajput R, *et al.* Evaluating the therapeutic efficiency and drug targeting ability of alkaloids present in *Rauwolfia serpentina* [J]. *Int J Green Pharm*, 2017, 11(3): 132-142.
- [2] Jerie P. Milestones of cardiovascular therapy. IV. Reserpine [J]. *Casopis Lékar Ceskych*, 2007, 146(7): 573-577.
- [3] 曹福祥, 徐庆军, 王承南, 等. 萝芙木属植物的物种和分布 [J]. 中南林业科技大学学报, 2007, 27(6): 154-158.
- [4] 冯毓秀, 王云萍, 楼之岑. 国产萝芙藤的降压作用 [J]. 药学报, 1981, 16(1): 45-52.
- [5] 林茂, 于德泉, 刘欣, 等. 红果萝芙木季胺碱的化学研究 [J]. 药学报, 1985, 20(2): 198-202.
- [6] 张丽珍, 杨冬业, 袁盼盼. 红果萝芙木植物组织培养及快速繁殖 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 44-46.
- [7] 戴斌, 丘翠嫦. 广西产六种萝芙木的资源调查及鉴定 [J]. 中国民族民间医药, 2003, 61(2): 114-116.
- [8] Biradar N, Hazarika I, Chandy V. Current insight to the uses of *Rauwolfia*: A review [J]. *Res Rev: J Pharmacogn*, 2016, 3(3): 1-4.
- [9] Bunkar A R. Phytochemical and antimicrobial study of *Rauwolfia serpentina* [J]. *Int J Biol Res*, 2017, 2(2): 13-16.
- [10] Chauhan S, Kaur A, Pareek R K. Pharmacobotanical and pharmacological evaluation of ayurvedic crude drug: *Rauwolfia serpentina* (Apocynaceae) [J]. *Int J Green Pharm*, 2018, 11(4): S686-S693.
- [11] Gicquel T, Hugbart C, Le Devehat F, *et al.* Death related to consumption of *Rauwolfia* sp. powder mislabeled as *Tabernanthe iboga* [J]. *Forensic Sci Int*, 2016, doi: 10.1016/j.forsciint.2016.06.014.
- [12] Keshavan M S. The tale of *Rauwolfia Serpentina* and the contributions of Asian Psychiatry [J]. *Asian J Psychiatr*, 2011, 4(3): 214-215.
- [13] Nammi S, Boini K M, Koppula S, *et al.* Reserpine-induced central effects: Pharmacological evidence for the lack of central effects of reserpine methiodide [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2005, 83(6): 509-515.
- [14] Pathania S, Ramakrishnan S M, Randhawa V, *et al.* SerpentinaDB: A database of plant-derived molecules of *Rauwolfia serpentina* [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, doi: 10.1186/s12906-015-0683-7.
- [15] Ezeigbo I I, Ezeja M I, Madubuike K G, *et al.* Antidiarrhoeal activity of leaf methanolic extract of *Rauwolfia serpentina* [J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2012, 2(6): 430-432.

- [16] Abdelfatah S A, Efferth T. Cytotoxicity of the indole alkaloid reserpine from *Rauwolfia serpentina* against drug-resistant tumor cells [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(2): 308-318.
- [17] Bemis D L, Capodice J L, Gorroochurn P, *et al.* Anti-prostate cancer activity of a beta-carboline alkaloid enriched extract from *Rauwolfia vomitoria* [J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(5): 1065-1073.
- [18] Bhadane B S, Patil M P, Maheshwari V L, *et al.* Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review [J]. *Phytother Res*, 2018(2): 1-30.
- [19] Sabde S, Bodiwala H S, Karmase A, *et al.* Anti-HIV activity of Indian medicinal plants [J]. *J Nat Med Tokyo*, 2011, 65(3/4): 662-669.
- [20] Bisong S A, Brown R, Osim E E. Comparative effects of *Rauwolfia vomitoria* and chlorpromazine on locomotor behaviour and anxiety in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132(1): 334-339.
- [21] Elisabetsky E, Costacampes L. The alkaloid alstonine: A review of its pharmacological properties [J]. *Evid-Based Compl Alt Med*, 2006, 3(1): 39-48.
- [22] Bisong S A, Abuo F E, Udefa A L, *et al.* Comparative effects of alkaloid and saponin fractions of *Rauwolfia vomitoria* on social behaviour and depression in a CD1 mouse model of memory impairment [J]. *Arch Curr Res Int*, 2019, 16(1): 1-11.
- [23] Amoateng P, Quansah E, Karikari T K, *et al.* Medicinal plants used in the treatment of mental and neurological disorders in Ghana [J]. *Evid-Based Compl Alt Med*, 2018, doi: 10.1155/2018/8590381.
- [24] Ajao A A, Alimi A A, Olatunji O A, *et al.* A synopsis of anti-psychotic medicinal plants in Nigeria [J]. *Trans R Soc S Afr*, 2018, 73(1): 33-41.
- [25] Tekwu E M, Bosompem K M, Anyan W K, *et al.* In vitro assessment of anthelmintic activities of *Rauwolfia vomitoria* (Apocynaceae) stem bark and roots against parasitic stages of *Schistosoma mansoni* and cytotoxic study [J]. *J Parasitol Res*, doi: 10.1155/2017/2583969.
- [26] Attah S K, Ayeh-Kumi P F, Sittie A A, *et al.* Extracts of *Euphorbia hirta* Linn. (Euphorbiaceae) and *Rauwolfia vomitoria* Afzel (Apocynaceae) demonstrate activities against *Onchocerca volvulus* microfilariae in vitro [J]. *BMC Compl Alter Med*, 2013, doi: 10.1186/1472-6882-13-66.
- [27] Pathania S, Randhawa V, Bagler G. Prospecting for novel plant-derived molecules of *Rauwolfia serpentina* as inhibitors of Aldose Reductase, a potent drug target for diabetes and its complications [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61327.
- [28] Campbell-Tofte J I, Molgaard P, Josefsen K, *et al.* Randomized and double-blinded pilot clinical study of the safety and anti-diabetic efficacy of the *Rauwolfia-Citrus* tea, as used in Nigerian traditional medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133(2): 402-411.
- [29] Azmi M B, Qureshi S A, Ahmed S D H, *et al.* Ameliorative effect of hydro-methanolic extract from roots of *Rauwolfia serpentina* on some biochemical parameters of type 1 diabetic mice [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2018, 31(Suppl 2): 663-668.
- [30] Yu J, Chen Q. Antitumor activities of *Rauwolfia vomitoria* extract and potentiation of gemcitabine effects against pancreatic cancer [J]. *Integr Cancer Ther*, 2014, 13(3): 217-225.
- [31] Dong R, Chen P, Chen Q. Inhibition of pancreatic cancer stem cells by *Rauwolfia vomitoria* extract [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(6): 3144-3154.
- [32] Salehi B, Kumar N V A, Sener B, *et al.* Medicinal plants used in the treatment of human immunodeficiency virus [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, doi: 10.3390/ijms19051459.
- [33] Chauhan S, Kaur A, Vyas M, *et al.* Comparison of antidiabetic and antioxidant activity of wild and cultivated variety of *Rauwolfia serpentina* [J]. *Asian J Pharm Clin Res*, 2017, 10(12): 404-406.
- [34] Afsheen N, Khalil U R, Jahan N, *et al.* Cardioprotective and metabolomic profiling of selected medicinal plants against oxidative stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, doi: 10.1155/2018/9819360.
- [35] Zaitseva O O, PoleZhaeva T V, Khudvakov A N, *et al.* Application of pectin from *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth to the cryopreservation of human leucocyte cell suspensions [J]. *Cryo Lett*, 2018, 39(1): 72-78.
- [36] Khudyakov A N, Kuleshova L G, Zaitseva O O, *et al.* Effect of pectins on water crystallization pattern and integrity of cells during freezing [J]. *Biopreserv Biobank*, 2019, 17(1): 52-57.
- [37] Bakhtiarpoor M M, Setorki M P, Kaffashian M R P. Effects of essential oil of *Satureja bachtiarica* Bunge in a rat model of reserpine-induced depression [J]. *Iran J Med Sci*, 2018, 43(4): 409-415.
- [38] Peres F F, Levin R, Suiama M A, *et al.* Cannabidiol prevents motor and cognitive impairments induced by reserpine in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2016, doi: 10.3389/fphar.2016.00343.
- [39] Bispo J M M, Melo J E C, Gois A M, *et al.* Sex differences in the progressive model of parkinsonism induced by reserpine in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2019,

- doi: 10.1016/j.bbr.2019.01.041.
- [40] Leal P C, Bispo J M M, Engelberth R C G J, *et al.* Serotonergic dysfunction in a model of parkinsonism induced by reserpine [J]. *J Chem Neuroanat*, 2019, doi: 10.1016/j.jchemneu.2018.12.011.
- [41] Isyraqiah F, Kutty K, Durairajanayagam D, *et al.* Effect of reserpine on the expression of tumour promoter, tumour suppressor and ulcer healing genes in the stomach of female Sprague-Dawley rats [J]. *Int Med J*, 2019, 26(1): 2-6.
- [42] Mossoba M E, Flynn T J, Vohra S, *et al.* Human kidney proximal tubule cells are vulnerable to the effects of *Rauwolfia serpentina* [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2016, 31(6): 285-293.
- [43] Barleben L, Panjikar S, Ruppert M, *et al.* Molecular architecture of strictosidine glucosidase: The gateway to the biosynthesis of the monoterpenoid indole alkaloid family [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(9): 2886-2897.
- [44] Ma X, Panjikar S, Koepke J, *et al.* The structure of *Rauwolfia serpentina* strictosidine synthase is a novel six-bladed beta-propeller fold in plant proteins [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(4): 907-920.
- [45] Stoeckigt J, Panjikar S. Structural biology in plant natural product biosynthesis--architecture of enzymes from monoterpenoid indole and tropane alkaloid biosynthesis [J]. *Nat Prod Rep*, 2007, 24(6): 1382-1400.
- [46] Xia L, Ruppert M, Wang M, *et al.* Structures of alkaloid biosynthetic glucosidases decode substrate specificity [J]. *ACS Chem Biol*, 2012, 7(1): 226-234.
- [47] Stöckigt J, Panjikar S, Ruppert M, *et al.* The molecular architecture of major enzymes from ajmaline biosynthetic pathway [J]. *Phytochem Rev*, 2007, 6(1): 15-34.
- [48] Bayer A, Ma X, Stöckigt J. Acetyltransfer in natural product biosynthesis--functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2004, 12(10): 2787-2795.
- [49] Sun L, Chen Y, Rajendran C, *et al.* Crystal structure of perakine reductase, founding member of a novel aldo-keto reductase (AKR) subfamily that undergoes unique conformational changes during NADPH binding [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(14): 11213-11221.
- [50] Sun L, Ruppert M, Sheludko Y, *et al.* Purification, cloning, functional expression and characterization of perakine reductase: The first example from the AKR enzyme family, extending the alkaloidal network of the plant *Rauwolfia* [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 67(5): 455-467.
- [51] Dang T T, Franke J, Tatsis E C, *et al.* Dual catalytic activity of a cytochrome P450 controls bifurcation at a metabolic branch point of alkaloid biosynthesis in *Rauwolfia serpentina* [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(32): 9440-9444.
- [52] Pasquali G, Porto D D, Fetsch A G. Metabolic engineering of cell cultures versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpenoid indole alkaloids: Recent progress related to old dilemma [J]. *J Biosci Bioeng*, 2006, 101(4): 287-296.
- [53] Kutchan T M, Hampp N, Lottspeich F, *et al.* The cDNA clone for strictosidine synthase from *Rauwolfia serpentina*. DNA sequence determination and expression in *Escherichia coli* [J]. *FEBS Lett*, 1988, 237(7): 40-44.
- [54] Gantet P, Memelink J. Transcription factors: Tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, 23(12): 563-569.
- [55] Pauw B, Hilliou F A O, Martin V S, *et al.* Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(51): 52940-52948.
- [56] Prakash P, Rajakani R, Gupta V. Transcriptome-wide identification of *Rauwolfia serpentina* microRNAs and prediction of their potential targets [J]. *Comput Biol Chem*, 2016, doi: 10.1016/j.compbiolchem.2015.12.002.
- [57] Góngora-Castillo E, Childs K L, Fedewa G, *et al.* Development of transcriptomic resources for interrogating the biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids in medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52506.
- [58] Corbin C, Lafontaine F, Sepúlveda L J, *et al.* Virus-induced gene silencing in *Rauwolfia* species [J]. *Protoplasma*, 2017, 254(4): 1813-1818.
- [59] Kellner F, Kim J, Clavijo B J, *et al.* Genome-guided investigation of plant natural product biosynthesis [J]. *Plant J*, 2015, 82(4): 680-692.