

- 3 Komori T, *et al.* Chem Bet, 1968, 10(9): 3096
- 4 Komori T, *et al.* Liebigs Ann Chem, 1973, (5/6): 978
- 5 Ida Y, *et al.* Liebigs Ann Chem, 1978, (5): 834
- 6 Murray R D H. Phytochemistry, 1984, 23(3): 623
- 7 福州军区军事医学科学研究所. 中草药, 1980, 11(11): 522
- 8 Wij M, *et al.* Ind J Chem, 1978, 16(B): 643
- 9 Gupta D, *et al.* Phytochemistry, 1989, 28(3): 947
- 10 Adensanya S, *et al.* Phytochemistry, 1989, 28(3): 773
- 11 张志明, 等. 微量元素, 1987, (1): 44
- 12 Webster J, *et al.* J Agric Food Chem, 1984, 32: 1087
- 13 Ozo O N, *et al.* Phytochemistry, 1984, 23(2): 329
- 14 Giacometto A P, *et al.* Arq Biol Technol (Curitiba), 1987, 30(2): 317
- 15 Raghunandan K V, *et al.* Ind J Pharm Sci, 1987, 49(6): 233
- 16 Qpute F I, *et al.* J Sci Food Agric, 1978, 29: 959
- 17 Splittstoesser W E, *et al.* J Amer Soc Hort Sci, 1973,

- 18 Saxon E C. Econ Bot, 1981, 35(2): 163
- 19 付正声, 等. 西北师学报(自然科学版), 1986, (1): 30
- 20 沈序维, 等. 高等学校化学学报, 1987, 8(6): 528
- 21 中药辞海编辑委员会. 中药辞海(第一卷). 北京: 中国医药科技出版社, 1994. 2407
- 22 山东医学院生理教研组. 山东医学院学报, 1961, (1): 11
- 23 曹仁烈, 等. 中华皮肤科杂志, 1957, (4): 286
- 24 山东医学院药理教研组. 山东医学院学报, 1959, (13): 87
- 25 陈芳. 江苏中医, 1995, 16(7): 9
- 26 丁国明, 等. 中草药, 1992, 23(4): 192
- 27 唐迎雪. 中国中药杂志, 1995, 20(7): 435
- 28 胡熙明. 中国中医秘方大全(中). 上海: 文汇出版社, 1989. 91
- 29 张信义. 浙江中医杂志, 1993, 28(2): 57
- 30 潘锦堂. 植物分类学报, 1994, 32(4): 316

(1997-05-20 收稿)

培养细胞中小檗碱的产生及其生物合成研究概况

云南大学生物系(昆明 650091) 王 东* 李启任

摘 要 从愈伤组织的诱导, 影响细胞生长和小檗碱合成的因子, 提高细胞生长和小檗碱含量的方法及小檗碱的生物合成途径方面作了综述, 并展望了未来的发展趋势。

关键词 小檗碱 细胞培养 生物合成

小檗碱(berberine)又称黄连素, 是苕基异喹啉生物碱中原小檗碱型的一种。它广泛地存在于小檗科、毛茛科、防己科、芸香科、罂粟科及鼠李科等的多种植物体内^[1], 传统上小檗碱就作为一种广谱抗菌、消炎及健胃药而广为应用。长期以来人们只能从植株中来提取小檗碱, 由于需求量大, 过度采挖造成野生资源的枯竭以及生态环境的破坏; 另外栽培上存在着一定困难。因此, 寻找新的药源成为人们所关注的问题。众多的研究者将注意力放到了利用植物组织和细胞培养技术生产

小檗碱的研究上。现结合我们的工作, 将有关组织和细胞中小檗碱的产生及其生物合成途径的研究进展概述如下。

1 培养细胞中小檗碱的产生

1.1 愈伤组织的诱导: 1967 年首先从欧洲小檗 *Berberis vulgaris* L. 的愈伤组织中分离到了小檗碱。其后从不同植物的不同器官中也诱导产生了愈伤组织^[2~5], 其中小檗碱的含量有的已达到或超过了原植物体中的含量^[2,5]。

1.2 影响细胞生长和小檗碱合成的因子: 许

* Address: Wang Dong, Department of Biology, Yunnan University, Kunming

王 东 男, 27 岁, 硕士, 讲师。主要从事植物生理和植物生物工程的教学和科研工作。研究方向为植物次生代谢细胞工程。已在国内刊物上发表论文 3 篇。

多研究表明,在细胞培养过程中,多种理化因子对细胞的生长和小檗碱的合成有显著的影响。因此,通过对有关理化因子的控制,将起到提高细胞生长速率和小檗碱合成能力的作用。

1.2.1 化学因子:不同的培养基对细胞生长和小檗碱合成有明显的影响。LS、B₅、SH、Nitch 等培养基能促进日本黄连 *Coptis japonica* L. 愈伤组织的生长。而 White、Heller 和 Eriksson 培养基则抑制生长;小檗碱含量在 White 培养基中最高,B₅ 和 White 培养基对小檗碱的产生有促进作用;日本黄连的悬浮培养细胞在 White 培养基上效果最好^[2]。6,7-V 培养基有利于黄连 *C. chinensis* Franch. 愈伤组织的生长^[3]。粉叶小檗 *B. pruinosa* Franch. 的愈伤组织在 B₅ 培养基上细胞生长和小檗碱的合成均优于 MS 培养基^[5]。

植物激素长期以来就被认为在细胞生长和生物碱合成中扮演着重要的角色。不同浓度的 2,4-D 刺激亚欧唐松草 *Thalictrum minus* L. 培养细胞产生大量的小檗碱;高浓度的 KT 和 BA 使掌叶防己碱和药根碱的合成能力降低,而对小檗碱的产生没有影响^[2,6]。2,4-D 和 NAA 促进亚欧唐松草悬浮培养细胞中小檗碱的形成;BA 和 KT 也对小檗碱合成有刺激作用^[7]。在粉叶小檗的愈伤组织培养中,生长素类对生长的作用效果是 2,4-D>IAA>NAA,而对小檗碱合成的影响效果则是 NAA>2,4-D>IAA;细胞分裂素中,KT 在细胞生长和小檗碱合成方面均优于 BA^[5]。

蔗糖对日本黄连的细胞生长和小檗碱的合成最有效,蔗糖最适浓度为 3%,果糖和葡萄糖促进细胞生长但抑制小檗碱的形成^[2]。亚欧唐松草的细胞培养中,硝态氮和氨态氮的不同比例导致不同的结果^[8]。提高培养基中铵离子的水平有利于原小檗碱型生物碱的产生,提高培养基中铜离子浓度也能显著地促进小檗碱的合成^[9]。

1.2.2 物理因子:光抑制日本黄连培养细胞的生长和小檗碱的合成,而较高的通气量对细胞生长和小檗碱的合成均有促进作用^[2]。在威氏小檗 *B. wilsonae* Hemsl. 的细胞发酵培养中,溶氧率能影响小檗碱的形成,最适溶氧率为 50%,总生物碱产率可达 3 g/L 培养基^[10]。日本黄连细胞发酵培养的研究中,许多物理因子对细胞生长和小檗碱合成的影响也有报道^[11]。

1.3 提高细胞生长和小檗碱含量的方法:利用日本黄连的培养细胞进行细胞团来源的高产无性系的筛选获得了成功,小檗碱含量可达干重的 10.1%^[2]和 13%^[12],产率可达 1.2 g/L 培养基,同时伴随着一些新技术的应用,筛选的效率大为提高。此外,细胞高密度培养法,培养基的优化及合成前体的添加等对小檗碱的形成也有促进作用。令人感兴趣的是,利用黄连和黄柏的细胞融合体提高了小檗碱的含量,这一实验表明利用体细胞杂交技术提高小檗碱的含量是可能的。随着分子生物学的迅速发展。许多相关的方法和手段也被利用来促进培养细胞中生物碱的合成。Kutchan 等曾将 H6H 基因转移至大肠杆菌中使其高效表达,并且能使培养基中的莨菪胺转化成东莨菪碱^[13],这一结果吸引了人们的注意。研究者们也试图通过基因调节和转基因的方法来促进小檗碱的产生。

2 小檗碱的生物合成

早在 1910 年,人们就提出了苜基异喹啉生物碱合成途径的假说。认为这类生物碱的合成始于两个来自酪氨酸的芳香族单位:多巴胺和 3,4-二羟苯乙醛。后发现了一种能催化多巴胺和 3,4-二羟苯乙醛缩合形成去甲劳丹碱(norlaudanosoline)的酶(去甲劳丹碱合成酶),值得注意的是该酶与 3,4-二羟苯乙醛、4-羟苯乙醛的 K_m 值基本一致,故认为该酶也能催化多巴胺和 4-羟苯乙醛形成去甲衡州乌药碱(norcoclaurine)^[14,15]。研究认为在苜基异喹啉生物碱合成的早期阶段,去甲劳丹碱合成酶能催化多巴胺和苯乙醛类物

质合成去甲劳丹碱和去甲衡州乌药碱这两个合成途径中的重要中间体^[16]。但随后发现,原来所认为的底物 3,4-二羟苯乙醛并不是体内合成的前体,真正的前体应为 4-羟苯乙醛^[17,18]。经此酶作用,4-羟苯乙醛与多巴胺缩合形成苄基异喹啉生物碱生物合成的第一个中间体去甲衡州乌药碱。故现在将此认为是苄基异喹啉生物碱的生物合成途径^[19]。

番荔枝碱(reticuline)一直就被认为是苄基异喹啉生物碱合成的另一个重要中间体^[20]。由去甲衡州乌药碱形成番荔枝碱需经过几次甲基化作用,它所接受的甲基由腺苷甲硫氨酸提供,通过这些甲基化作用及另一特殊酚酶的作用,去甲衡州乌药碱能转化为番荔枝碱^[21]。

从小檗碱的结构上看,它有一个完整的 C 环,因此要形成小檗碱必须使番荔枝碱的 N-甲基形成所谓的小檗碱桥(berberine bridge)。分离鉴定了一种被称为小檗碱成桥酶(BBE)的蛋白质,在此酶的作用下,番荔枝碱能成环作用而形成金黄紫堇碱(scoulerine)^[22]。番荔枝碱必须先进入一特殊的泡囊内才能完成这一步转化,有研究表明小檗碱合成途径中后面所需的大多数酶均存在于这一特殊泡囊结构中^[21]。金黄紫堇碱在甲基转移酶的作用下从腺苷甲硫氨酸获得甲基形成四氢非洲防己碱(tetrahydrocolumbamine)。先前的研究曾认为,四氢非洲防己碱在四氢原小檗碱氧化酶的催化下脱氢而形成对应的原小檗碱型生物碱非洲防己碱,之后在亚甲基双氧环成环酶的催化下形成 A 环上的特殊亚甲基双氧环结构,从而最终形成小檗碱^[16]。但最近的研究^[23]表明,所谓的亚甲基双氧环成环酶活力的增强实际上是由该泡囊内过氧化物酶的脱甲基作用所引起,而并不代表亚甲基双氧环的形成;另外,从小檗属、唐松草属和黄连属等植物微体中得到的一种细胞色素 P₄₅₀酶能使四氢非洲防己碱形成亚甲基双氧环,而对非洲防己碱则不起作用^[21]。正是因为这种氢化小檗碱

(canadine)合成酶的底物特异性,四氢非洲防己碱能在其作用下形成氢化小檗碱。小檗碱合成的最后步骤由四氢原小檗碱氧化酶或氢化小檗碱氧化酶催化,利用氢化小檗碱为底物氧化脱氢而最终形成小檗碱。此外,许多研究也发现小檗碱并非代谢的终产物^[19],它还能进一步转化为药根碱(jatrorrhizine)。

现将当前认为的小檗碱生物合成的主要途径概述于图 1。此途径已在黄连属^[24]和唐松草属^[25]中发现,在小檗属中可能也存在^[21]。小檗碱生物合成途径的阐明及途径中控制各步反应的酶的分离鉴定,为人们从底物和酶水平调节其代谢途径打下了基础。按次生物质合成途径的模式图^[26]来看,小檗碱生物合成的重要中间体应为番荔枝碱。番荔枝碱能在 BBE 的作用下,通过氧化成环作用而形成所谓的小檗碱桥,从而构成原小檗碱生物碱的基本骨架——金黄紫堇碱,因此 BBE 被认为是小檗碱合成途径中的第一个关键酶,将 cDNA 克隆得到的编码 BBE 的基因转入昆虫培养细胞中获得了高水平的表达^[27];此外还认为四氢原小檗碱氧化酶也可能是一个关键酶,因为它在使 C 环芳香化中起重要作用,只有经过这一步氧化后才能最终形成小檗碱^[28]。

3 结语

通过对控制各步骤的酶的深入研究,将外源克隆的生物碱代谢基因转入植物体或培养细胞中也许会为植物生物工程的商业化应用提供一个机会,但总的来说,一种生物碱的合成是由多种酶在时空顺序上表达所控制的多级代谢所构成,因而单独某一基因的过表达并不总是能导致代谢终产物的产量明显增加^[28,29]。提高限速酶活力的转基因方法仅能使有限的代谢步骤得以改进,用次生物质的植物生物工程的应用,可能主要应依靠对控制一系列合成基因的调节基因的分子克隆来实现^[21]。相信随着对代谢调节基因和生物碱合成胞内定位研究的深入,植物次生代谢生物工程必将发生深刻的变化,人为控制目的

物的生产将不再是一个遥远的梦。

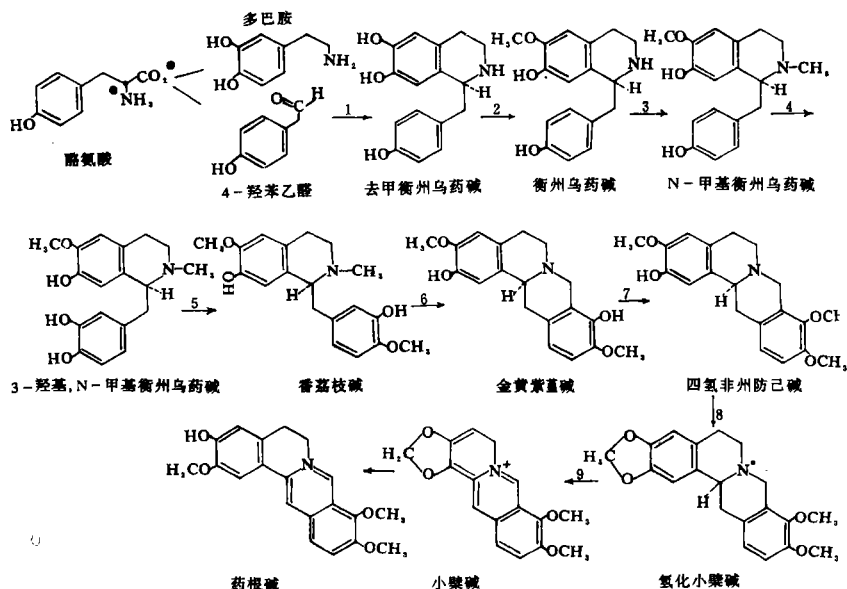


图 1 小檗碱的生物合成途径

注:1-去甲衡州乌药碱合成酶 2-去甲衡州乌药碱-6'-O-甲基转移酶 3-衡州乌药碱 N-甲基转移酶 4-酚酶(?) 5-4'-O-甲基转移酶 6-小檗碱成桥酶 7-金黄紫堇碱-9'-O-甲基转移酶 8-氢化小檗碱合成酶 9-四氢原小檗碱氧化酶或氢化小檗碱氧化酶

参考文献

- 1 国家医药管理局中草药情报中心站编. 植物药有效成分手册. 北京: 人民卫生出版社, 1986. 120
- 2 Fujiwara A (eds). In Plant Tissue Culture 1982. Proceedings. 5th Intl Cong Plant Tissue & Cell Cultue. Tokyo, Japan, 1982. 311, 313, 315, 319
- 3 胡之璧, 等. 植物生理学通讯, 1988, 24(6): 34
- 4 芮和恺, 等. 中药材, 1990, 13(3): 3
- 5 李启任, 等. 云南植物研究, 1995, 17(3): 325
- 6 Jkuta A, *et al.* Phytochemistry, 1982, 21: 1419
- 7 Nakagawa K, *et al.* Plant Cell Rep, 1986, 5: 69
- 8 Hakagawa K, *et al.* Plant Cell Rep, 1984, 3: 254
- 9 Morimoto T, *et al.* Agric Bio Chem, 1988, 52(7): 1835
- 10 Keris W, *et al.* Planta Med, 1989, 257: 127
- 11 Fujita F, *et al.* In Application of Plant Cell and Tissue Culture. Yamada Y (eds) Chichester: Wiley, 1988. 228
- 12 Yamada Y, *et al.* Phytochemistry, 1985, 24: 63
- 13 Kutchan T M. FEBS Lett, 1989, 257: 127
- 14 Rueffer M, *et al.* FEBS Lett, 1981, 129: 5
- 15 Anderson L A, *et al.* In Advancing in Biochemical Engineering/Biotechnology. Fiechter A (eds). Berlin: Springer-Verlag, 1985. 31: 8
- 16 Zenk M H, *et al.* In The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. Phillison J D, *et al.* (eds). Berlin: Springer-Verlag, 1985. 240

- 17 Rueffer M, *et al.* Z Naturforsch, 1987, 422; 319
- 18 Zenk M H. *et al.* In Application of Plant Cell and Tissue Culture. Yamada Y (eds) Chichester; Wiley, 1988. 213
- 19 Herbert R B. In The Biosynthesis of Secondary Metabolites. London; Chapman and Hall, 1989. 141
- 20 Herbert R B. In The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. Phillison J D, *et al* (eds). Berlin; Springer-Verlag, 1985. 213
- 21 Hashimoto T. *et al.* Annu Rev Plant Physiol Mol Biol, 1994, 45; 257
- 22 Steffens P, *et al.* Tetrahedron Lett, 1984, 25; 951
- 23 Bauer W, *et al.* Bot Acta, 1992, 105; 370
- 24 Muller M J, *et al.* Planta Med, 1992, 58; 524
- 25 Galneder E. *et al.* In Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Nijkamp H J J, *et al* (eds). Dordrecht; Kluwer, 1990, 754
- 26 Yeoman M M. *et al.* In Plant Cell Culture; Results and Perspectives. Sala F. *et al* (eds). Elsevier North-Holland Biochemical Press, 1980. 327
- 27 Kutchan T M. J Plant Physiol, 1994, 42(4); 502
- 28 Descenzo R A, *et al.* Plant Mol Biol, 1993, 22; 113
- 29 Sonkstad D D. *et al.* Plant Physiol, 1990, 94; 1410

(1997-06-10 收稿)