

· 综述 ·

鬼臼毒素资源研究现状

杨显志,邵 华,张玲琪*,周 成,宣 群,杨春燕

(云南大学 生命科学与化学学院教育部微生物资源开放研究重点实验室,云南 昆明 650091)

摘 要: 鬼臼毒素衍生物 VP₁₆, VM₂₆等对人体多种癌症都具有较好疗效,美国 FDA已批准应用于临床,但鬼臼毒素的资源植物鬼臼类植物却十分有限,因此如何合理利用和扩大资源是当前研究的焦点。综述了鬼臼毒素以及国内外在鬼臼毒素资源方面所作的研究,指出了存在的主要问题及今后的研究前景。

关键词: 抗癌物质;鬼臼毒素;资源;内生真菌

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2001)11-1042-03

Present situation of studies on resources of podophyllotoxin

YANG Xian-zhi, SHAO Hua, ZHANG Ling-qi, ZHOU Cheng, XUAN Qun, YANG Chun-yan

(College of Life Science and Chemistry, Yunnan University, Kunming Yunnan 650091, China)

Key words anticancer substance; podophyllotoxin; resources; endophytic fungi

1 鬼臼毒素及其作用机制

鬼臼毒素 (podophyllotoxin, C₂₂H₂O₈)属于木脂体类 (lignans),主要存在于小檗科 (Berberidaceae)多年生草本类群鬼臼亚科 (Podophylloideae)八角莲属 (*Dysosma* Woodson),桃儿七属 (*Sinopodophyllum* Ying),山荷叶属 (*Diphylleia* Michx)及足叶草属 (*Podophyllum* L.)植物中。这些植物由于都具有盾状着生的叶,茎中具有多数散生微管束,花不具蜜腺,浆果,含鬼臼毒素等一些共同特征而被看作一个自然而相对独立的类群,习惯上称为鬼臼类植物^[1]。鬼臼类植物是一类含有显著生物活性物质,又有悠久应用历史的药用植物。我国汉代的《神农本草经》中就有鬼臼的记述。历来主要用于蛇咬伤、痈疽肿毒、跌打损伤、风湿筋骨痛及气管炎等症。国外的美洲桃儿七 *Podophyllum peltatum* L. 在民间亦早供药用;早在 1880年,Podwysotskii就从美洲桃儿七的树脂中分出结晶性成分鬼臼毒素。King和 Sullivan报道鬼臼毒素具有秋水仙碱样作用之后,引起人们的普遍注意,并导致一系列的医学、生物学和化学的研究,证明了鬼臼毒素的抗癌活性^[2]。已知的抗癌作用机制有两种:其一是抑制微管蛋白的聚合作用和阻断中期相细胞分裂;其二是抑制 DNA拓扑异构酶活性^[3]。鬼臼毒素虽有显著的抗癌活性,但其毒副作用较大,不适于直接在临床上应用。自 20世纪 50年代初开始,以它为母体改造所得的一些衍生物具有活性高、毒性低的特点,有望用于临床治疗多种疾病^[4-6]。其中的糖苷衍生物鬼臼乙叉苷 (etoposide, VP₁₆,又名依托泊苷)和鬼臼噻吩苷 (teniposide, VM₂₆,又名特尼泊苷)的临床效果优越,是治疗睾丸癌、淋巴瘤、白血病、小细胞肺癌的重要药

物^[7,8]。体外实验还证明 VP₁₆能增强抗癌药物对黑色素瘤的疗效^[9]。目前,这两种药物已被美国 FDA批准上市,并具有较大市场潜力^[10]。

2 解决鬼臼毒素资源短缺的几条途径

由于鬼臼毒素的某些衍生物在临床上显示出较好疗效,对其需求量日益增加,其资源问题也就成为研究的热点。国内外从化学全合成、半合成、植物资源、植物细胞组织培养、植物内生真菌发酵等几方面进行了一些研究。

2.1 化学合成:化学全合成是很有前途的方法,纵观国内外的有关报道,大致可归纳为三大途径:1)γ氧酯路线;2)二羟基羧酸路线;3)串连共轭加成路线^[11]。总的说来,鬼臼毒素的化学全合成步骤都较多,且由于中间体立体结构对最终获得的鬼臼毒素类各异构物的构型有决定性的影响,这样就增加了合成难度,从而使全合成鬼臼毒素很不经济。20世纪 60年代,瑞士山道士公司先后半合成了 VP₁₆, VM₂₆。近年来又以 VP₁₆, VM₂₆为前体合成了一系列新的糖基衍生物,以 VP₁₆为前体合成的 bodipy-etoposide就是其中一个代表,其生物活性与 VP₁₆近似,且选择性高,目前尚在进一步研究中^[6]。但化学半合成(即进行结构改造)本身就需要天然鬼臼毒素作为原料。

2.2 从植物中提取是目前获得鬼臼毒素的主要途径:鬼臼毒素目前主要是从野生鬼臼类植物西藏鬼臼 *Podophyllum hexandrum* Royle(又名印度鬼臼)和盾叶鬼臼 *Podophyllum peltatum* (又名美洲鬼臼)等的根和茎中提取^[12]。鬼臼类植物共有 4属 15种,分布于东亚、北美。除足叶草属外,我国分布有 3属即山荷叶属、八角莲属和桃儿七属,共有 12种,其中

收稿日期: 2001-05-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39860005);云南省应用基础研究基金资助项目(96C009M)

作者简介:杨显志(1968-),男,四川省安岳县人。1995年毕业于四川教育学院生物系本科,曾在四川省安岳县任中学教师。现为云南大学生物学微生物学专业硕士研究生,师从张玲琪教授。主要从事植物真菌及其产次生活性代谢产物方面的研究。

* 通讯联系人 Tel (0871) 5033159

11种为我国特有种。我国是这类植物的分布中心及多样性中心^[1]。但总的来看,鬼臼类植物生长缓慢,对环境的要求较为苛刻,在全世界分布极其少,且分布零散,野生资源有限。鬼臼毒素在植物中的含量也很低^[2,12,13]。故靠采挖野生植物提取受到极大限制,甚至导致物种枯竭,造成生物多样性和生态环境无法弥补的损失。由于鬼臼毒素在医药上具有重要的价值,人们为了商业上的利益而不断采挖,已使野生植物资源遭到极大的破坏^[14,15],因此,是不宜提倡的。我们也可进行引种驯化,有计划地人工栽种,这是当前解决资源短缺的最快捷、最经济的办法。陕西凤县等地药农在低山区引种驯化桃儿七获得了成功^[16]。马绍宾等对桃儿七、南方山荷叶、川八角莲进行了初步的引种栽培实验^[14,15,17]。但如何使栽培种易于存活,且生长迅速,适应性广,保持野生种产鬼臼毒素及其类似物的特性甚至含量有所提高,是一个值得深入研究的课题。为从根本上解决鬼臼毒素的资源问题尚需开辟新的途径。

2.3 植物细胞组织培养是获取鬼臼毒素的一条重要途径:从植物细胞或器官组织培养中提取植物药用成分,已越来越受到人们的重视,细胞组织培养被认为是解决资源问题的一条重要途径。国内外已有研究者在这方面做了一些工作,并有报道说在细胞组织培养物中检测到鬼臼毒素^[10,18,19]。而优化培养条件和选择高产细胞系等有利于提高产物含量,降低生产成本。这主要是从物理因子(如光、温度)、化学因子(如选择不同的基本培养基,不同激素组合及配比)以及饲喂前体、加入诱导子等方面进行调控,也可以通过形态分化(如根及发状根培养)及基因工程技术,使抗癌化合物的含量尽可能提高。近年来,国外研究者围绕提高含量也做了大量研究。由澳洲柏属一种植物 *Callitris drummondii* 的针叶诱导出的愈伤组织能合成鬼臼毒素,原植物含量为 1.56%,培养细胞内为 0.02%,但愈伤组织在光照条件下生长,能促进鬼臼毒素的合成,含量提高到 0.11%。不同的激素对鬼臼毒素的合成也有影响。Heyenga等认为,鬼臼毒素的合成与生长素的合成有关,有利于组织分化的激素可提高其含量。Uden等报道,在含 NAA 的培养基中培养的亚麻细胞 5-甲氧基鬼臼毒素的含量相当低,仅为细胞干重的 0.004%,将培养细胞转至不含 NAA 的培养基中培养,可使其含量提高 40~50倍。他们还筛选出了一种形态上分化成根的细胞系,从培养基中去掉 NAA 可导致更多这样的分化根产生,5-甲氧基鬼臼毒素含量提高 2.6倍。从培养基中去掉维生素及激素,其含量可提高 6倍,占细胞干重的 1.01%。如果将培养基中蔗糖含量提高 1倍即 60 g/L,则 5-甲氧基鬼臼毒素含量可达 121.4 mg/L。饲喂前体也可使鬼臼毒素含量大幅度提高。如在亚麻属植物培养细胞中加入苯丙氨酸可使含量提高 3~5倍。在西藏鬼臼培养细胞中添加 7种苯丙烷类化合物的合成前体,能将 Comiferin 转化为鬼臼毒素,并使其含量提高 12.8倍^[10]。到目前为止,细胞组织培养法生产鬼臼毒素仍处在研究阶段,要实现规模生产,仍有很长的路要走。

2.4 利用植物内生真菌发酵是一条全新的途径:基于某些

真菌能产生和其伴生植物相同或相似生理活性物质的特点,通过对药用植物内生真菌的分离、纯化,以期从中筛选出可产生与宿主植物相似的活性成分的菌株,通过真菌发酵生产活性产物。1993年,美国 Strobel等从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* Natt 树皮中分到一株产紫杉醇的内生真菌安德低紫杉霉 *Taxomyces andreanae*^[20,21]。由此开辟了利用植物内生真菌发酵提取抗癌活性成分的新途径。近几年来,已有许多研究者都做过这方面的工作^[22~25]。近年来,云南大学张玲琪教授等一直在从事着药用植物内生真菌研究,尤其是内生真菌发酵提取抗癌成分的研究。李海燕等从桃儿七 *S. hexandrum* 茎中分到一株能产鬼臼毒素的内生真菌(97T₃₁)^[26]。张玲琪等从长春花 *Catharanthus roseus*(L.) G. Don 树皮中分到一种内生真菌(97CG₃),证明该菌能产长春新碱^[27]。最近曾松荣等又分别从南方山荷叶 *Diphylleia sinensis* Li 川八角莲 *Dysosma veitchii* (Hemsl. et Wils.) Fu 中分到了产鬼臼毒素的内生真菌(云南大学硕士学位论文,尚未发表)。由此可见,利用植物内生真菌发酵生产与植物相同或相似的次生代谢活性产物是可能的。但就目前技术水平而言,每升真菌发酵液中仅能获得纳克级的抗癌活性成分。而要达到工业化生产,据认为须达到毫克级水平。因此,目前仍需要解决若干技术问题。对此有三条途径被认为是可行的:1)改造发酵工艺,优化发酵条件;2)进行菌种改造。美国华盛顿大学研究人员运用现代生物技术将紫杉醇合成酶基因转入紫杉醇产生菌中,有可能构建高产紫杉醇的“工程菌”,预计此“工程紫杉醇”的产量比天然真菌的产量提高几千倍^[28];3)寻找一个特殊的真菌调节剂。因为在许多植物—微生物共生体中,植物中某些微量的化合物对微生物产生目的产物是必不可少的,它可以启动微生物中某些遗传机能,促进目的产物的合成^[29]。

3 结语

综上所述,从植物中直接提取鬼臼毒素,在目前看来还是最有效、最经济、最迅速的办法,但也有许多亟待解决的问题,包括资源、持续供给和生态学问题。而且产品的分离纯化步骤繁多、复杂,也是最难解决的问题之一,它迫切需要新型化工分离技术和化工研究人员的参与。植物细胞组织培养分化难度大、细胞培养中细胞生长与产物均不稳定,一时无法实现大规模工业化生产。而微生物(真菌)易培养,易控制,生长快,并可通过诱变育种、细胞融合、基因工程等手段改良菌种性能,大幅度提高产量,组织工业化生产,因而利用植物内生真菌发酵生产鬼臼毒素这一新途径具有十分广阔的研究开发前景。纵观国内外,尽管目前对内生真菌产抗癌活性成分的研究还仅仅处于起步阶段,大部分工作仅限于菌种分离,对发酵条件、菌种改造、代谢调节等方面的工作做得还很少,但我们有理由相信,随着科技的进步,研究工作的全面深入开展,将会逐渐解决利用真菌发酵生产鬼臼毒素的一些难题,最终有效、持久地利用这一天然抗癌药物挽救千百万癌症患者的生命。

致谢:本文承蒙云南大学省微生物研究所魏蓉城教授审阅。

参考文献:

[1] 马绍宾,胡志浩.小檗科鬼臼亚科的地理分布与系统发育[J].云南植物研究,1997,19(1): 48-56.

[2] 陈毓亨.我国鬼臼类植物资源的研究[J].药学报,1979,14(2): 101-107.

[3] 潘勤.鬼臼毒素类环木脂素的甲醚衍生物[J].国外医药·植物药分册,1996,11(2): 73-74.

[4] Bohlin Lars, Rosen Boerje. Podophyllotoxin derivatives Drug discovery and development [J]. Drug Discovery Today, 1996, 1(8): 343-351.

[5] 王志光,尹述凡,马维勇,等.4-乙酰基-4'-脱氧-4'-去甲基鬼臼毒素衍生物的合成和抗肿瘤活性[J].药学报,1993,28(6): 422-427.

[6] 许重远,贾江滨,陈振德.4'-去甲基鬼臼毒素衍生物4-取代结构修饰研究进展[J].中草药,2000,31(5): 389-392.

[7] Gupta R S, Chenchiah P C. Synthesis and biological activities of the C-4 esters of 4'-demethylepipodophyllotoxin [J]. Anticancer Drug Design, 1987, 2(1): 13-23.

[8] 马辰,罗淑荣.鬼臼类植物中木脂素化合物的研究进展[J].中草药,1992,23(5): 271-275.

[9] 杨新波.鬼臼毒素抗肿瘤作用研究进展[J].国外医药·植物药分册,1996,11(4): 158-159.

[10] 陈士云,侯嵩生.植物细胞培养生产抗癌药物研究进展[J].天然产物研究与开发,1993,5(1): 61-65.

[11] Ward R S. 鬼臼毒及其有关化合物的合成[J].国外医药·植物药分册,1993,8(5): 206-210.

[12] Broomhead A J. 八角莲和两种山荷叶中抑制肿瘤的芳基萘满木脂素[J].国外医药·植物药分册,1991,6(5): 225.

[13] Shang Mingying, Xu Guojun, Xu Loushan, et al. Quantitative analysis of the podophyllotoxin, 4'-demethyldexypodophyllotoxin and deoxypodophyllotoxin in fruit, root and rhizome of *Podophyllum* Plants, by HPLC [J]. J. China Pharm Univer, 1996, 27(4): 219-222.

[14] 马绍宾,黄衡宇,张念玺.南方山荷叶中甸居群繁殖生物学研究[J].西北植物学报,2000,20(4): 628-637.

[15] 马绍宾.川八角莲繁殖生态学初步研究[J].植物生态学报,2000,24(6): 748-753.

[16] 李广民.介绍一种药用植物——桃儿七[J].植物学杂志,1975,2(2): 28.

[17] 马绍宾,徐正尧,胡志浩.桃儿七繁殖生物学研究[J].西北植物学报,1997,17(1): 49-55.

[18] Takemoto Masumi, Yamamoto Yuichi, Achiwa Kazuo, et al. The synthesis of podophyllotoxin derivatives etc. with plant cell cultures [J]. Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu, 1996, 38 643-648.

[19] 刘蕾,高增平,江佩芬.八角莲的组织培养品及野生品的化学成分对比研究[J].中国中药杂志,1997,22(10): 593-594.

[20] Strobel G, Stierle A, Stierle D, et al. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbiferous hyphomycete associated with pacific yew (*Taxus brevifolia*) [J]. Mycotaxon, 1993, 47 71-80.

[21] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of pacific Yew [J]. Science, 1993, 260 214-216.

[22] Strobel G, Yang X S, Sears J, et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana* [J]. Microbiology, 1996, 142 435-440.

[23] Li J Y, Strobel G, Sidhu R, et al. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum* [J]. M 1996, 142 2223-2226.

[24] 邱德有,黄美娟,方晓华,等.一种云南红豆杉内生真菌的分离[J].真菌学报,1994,13(4): 314-316.

[25] 王伟,贺雄雷,钟英长.南方红豆杉内生菌及紫杉烷类产物的初步鉴定[J].中山大学学报(自然科学版),1999,38(3): 116-118.

[26] 李海燕,王志军,张玲琪,等.一种桃儿七内生真菌的分离初报[J].云南大学学报(自然科学版),1999,21(3): 243.

[27] 张玲琪,郭波,邵华,等.长春花内生真菌的分离及其发酵产生药用成分的初步研究[J].中草药,2000,31(11): 805-807.

[28] 罗明典.微生物制药研究新进展[J].微生物学通报,1998,25(1): 61-62.

[29] 陈毓亨,程克棣.近年来国外紫杉醇资源研究进展[J].国外医学·药学分册,1994,21(1): 36-39.

葡萄籽提取物的质量评价

邵云东,胡光祥,於洪建,方立军

(天津市尖峰天然产物研究开发公司,天津 300192)

摘要:概述了葡萄籽提取物常规品质的各项指标,着重阐述了国内外对葡萄籽提取物中各成分指标的概念及其相应的含量测定方法。

关键词:葡萄籽提取物;原花青素;低聚原花青素;质量评价;检测方法

中图分类号: R282.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)11-1044-03

Quality evaluation of grape seed extract

SHAO Yun-dong, HU Guang-xiang, YU Hong-jian, FANG Li-jun

(Tianjin JIAN FEN G Natural Product R&D CO., Ltd., Tianjin 300192, China)

Key words grape seed extract; proanthocyanidins; OPCs (oligomeric proanthocyanidins); quality evaluating; assaying method