

· 专论与综述 ·

桃儿七的研究进展

刘海军¹, 徐 艳², 苏国庆¹, 李春燕³, 王 莉³, 刘玉军^{1,3*}

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 北京林业大学园林学院, 北京 100083;

3. 西藏农牧学院 林学系, 西藏 林芝 860000)

摘 要: 主要综述了国内外对桃儿七的研究进展。介绍了桃儿七的地理分布、系统发育、化学成分、生物学特性、资源现状及解决办法, 特别介绍了利用植物组织培养、细胞培养、生物反应器、毛状根培养等生物技术方法来生产鬼臼毒素的研究新进展。

关键词: 桃儿七; 鬼臼毒素; 细胞培养; 组织培养

中图分类号: R 282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0098-03

Research progress in *Sinopodophyllum emodi*LIU Hai-jun¹, XU Yan², SU Guo-qing¹, LI Chun-yan³, WANG Li³, LIU Yu-jun^{1,3}

(1. College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3. Forestry Department,

Tibet Agricultural and Animal Husbandry College, Linzhi 860000, China)

Key words: *Sinopodophyllum emodi* (Wall.) Ying; podophyllotoxin; cell culture; tissue culture

桃儿七 *Sinopodophyllum emodi* (Wall.) Ying 是小檗科桃儿七属多年生草本植物, 为我国珍稀的药用植物, 其根和根茎中含有大量的具有抗癌活性的木脂素类物质, 其中鬼臼毒素 (podophyllotoxin) 抗癌活性最高, 是合成 GP-7, VP-16 (etoposide) 和 VM-26 (teniposide) 等抗癌药物的起始物质^[1]。由于过度的采挖使原本稀少的野生桃儿七植物资源遭到了严重的破坏, 直至濒临灭绝, 早在 1992 年桃儿七就被《中国植物红皮书》收录。

1 地理分布与系统发育

桃儿七主要分布在我国甘肃、陕西、云南、四川和西藏等地, 锡金、不丹、印度北部、巴基斯坦、阿富汗东部和克什米尔也有分布。主要生长在喜马拉雅山及附近, 海拔多在 2 700~4 500 m 的高原地区。桃儿七在系统分类学上是有争议的, 原来属于足叶草属 (*Podophyllum* L.), 但自第 3 纪以来的长期分化, 应俊生发现亚洲的 *S. emodi* 的根状茎节状、叶非盾状、先花后叶、雄蕊 6、四合花粉与足叶草属足叶草 *P. peltatum* L. 的特征表现出显著的差异, 因此在 1979 年将 *P. emodi* 从足叶草属中分立出来建立了一个新属——桃儿七属 (*Sinopodophyllum* Ying)。在鬼臼类植物中, 以山荷叶属 (*Diphylleia* Michx.) 最为原始, 它通过两个方向进行演化: 一是保持其原来的异花授粉方向演化为足叶草属; 另一方向是转向自花授粉, 演化为八角莲属 (*Dysosma* Woodson), 然后再演化为桃儿七属。桃儿七属与足叶草属不具有直接的亲缘关

系, 它们在形态上的相似只是平行进化的结果^[2]。

2 化学成分

2.1 小叶莲的成分研究: 小叶莲为桃儿七的干燥果实, 为藏族人民常用的中草药, 已被《中华人民共和国药典》记载。味甘, 性平, 有小毒, 具有活血化瘀、调经的功能, 主要用于治疗血瘀经闭、难产、死胎、胎盘不下等症^[1]。尚明英等首次从小叶莲中分离并鉴定出 6 个化合物: 鬼臼毒素、去氧鬼臼毒素 (deoxypodophyllotoxin)、4'-去甲去氧鬼臼毒素 (4'-demethyldeoxypodophyllotoxin)、8-异戊烯基山萘酚 (8-prenylkaempferol)、柠檬酚 (citrusinol) 及 β -谷甾醇^[3]。

2.2 桃儿七的根及根茎成分研究: 桃儿七的根及根茎中主要含有木脂素类、黄酮类、皂苷、多糖及鞣质等化学成分。木脂素类成分主要为鬼臼毒素、去甲鬼臼毒素、鬼臼苦素 (picropodophyllin)、去氢鬼臼毒素 (dehydropodophyllotoxin)、鬼臼毒酮 (podophyllotoxone)、去氧鬼臼毒素 (deoxypodophyllotoxin)、异鬼臼苦酮 (isopicropodophyllone)、4'-去甲鬼臼毒酮 (4'-demethylpodophyllotoxone)、山荷叶素 (diphyllin)。黄酮类成分主要为槲皮素和山萘酚 (kaempferol) 及其苷类等。另外, 桃儿七的茎叶中也含有少量的鬼臼毒素^[1]。尚明英等应用 RP-HPLC 法测定鬼臼类生药中鬼臼毒素的含量结果表明: 桃儿七和南方山荷叶 (*Diphylleia sinensis* L.) 根茎和根中鬼臼毒素的含量较高。八角莲属除砒鳞八角莲 *Dysosma furfuracea* Bao 外, 其他种含量均低于 1%。鬼

* 收稿日期: 2003-05-15

基金项目: 西藏国际自然科学基金资助项目 (2001-66); 北京林业大学研究生培养基金资助项目

作者简介: 刘海军 (1978—), 男, 满族, 河北省承德市人, 现为北京林业大学生物学院植物学专业硕士研究生, 主要从事藏药组织培养与细胞工程方面研究。Tel: (010) 62390573 E-mail: lhjaxy@sohu.com

* 通讯作者

白毒素、去氧鬼臼毒素及鬼臼毒酮等木脂素类成分的含量高低可作为该类中药重要的质量评价标准,对合理开发利用鬼臼类植物资源具有重要的参考价值。

3 生物学特性研究

桃儿七主要以自花授粉为主,偶尔也进行异花授粉。徐正尧等首次发现桃儿七具有一种适应于自花授粉的传粉机制,即花尚未开放或刚开放时,雌蕊呈直立状,而一旦花完全开放时,子房柄会发生弯曲,以至整个雌蕊靠向某一花药,从而使柱头和花药黏合实现传粉,当传完粉之后,雌蕊又重新直立,此时受精作用也随之完成,整个传粉受精的过程只需4~6 h^[4]。在一般条件下,由种子萌发的桃儿七植株需要5~6年的时间方可性成熟进行有性生殖,每株平均产60粒种子,多者可达180粒。营养条件良好时,桃儿七也可以通过根茎进行营养繁殖^[5]。

4 解决桃儿七资源短缺的途径

由于以鬼臼毒素为母体的衍生物具有良好的抗癌作用,因此,人们大量的采挖桃儿七使原本稀少的野生植物资源显得严重不足。近几年,国内外的学者通过引种栽培、组织培养等手段扩繁桃儿七和应用细胞培养方法进行了生产鬼臼毒素的大量研究。

4.1 引种栽培:是目前解决桃儿七资源不足最快捷、最经济的途径。马绍宾等发现桃儿七是一种喜氮植物,丰富的有机质、充足的水分对其营养繁殖是必要的。最适合桃儿七生长的土壤为森林棕壤,土壤条件越好,母株年龄越大,营养积累越充足,营养繁殖的系数就越高,一株最多可分生出60余株小苗^[5]。桃儿七具有大量的须根,将整条根或将其切成5~20 cm长的小段进行根插繁殖,成苗率达50%,繁殖系数可达50~300^[5]。Prasad在进行*P. hexandrum* Royle的引种栽培实验时发现栽培种与野生型的鬼臼毒素的含量相差不大^[6]。在栽培之前,先用100 mmol/L BA处理*P. hexandrum*的根茎,生根率提高1倍;用0.25 mol/L GA₃处理种子,萌芽率可提高2倍^[7]。

4.2 桃儿七的组织培养:通过组织培养来快繁桃儿七是一条好的途径。Nadeem将从*P. hexandrum* 合子胚诱导的愈伤组织接种到附加NAA (5 mmol/L)和BA (0.5 mmol/L)的MS液体培养基中,经过4个月的悬浮培养,体细胞胚胎再生出小植株^[7]。Shama也报道了体细胞胚胎发生途径成功地再生出*P. hexandrum* 植株^[8]。Moraes把*P. peltatum*的根状茎尖接种到外加4.4 μmol/L BA、0.025%活性碳的MS固体培养基上,再生出的顶芽进而发育成小植株,同时还发现腋芽和不定芽再生顶芽的能力更强。经测定,再生植株的鬼臼毒素的含量和野生植株水平相当^[9]。

4.3 桃儿七的细胞培养:应用鬼臼类植物细胞培养生产鬼臼毒素的研究已有20多年的历史了。1981年Kadkade首次将*P. peltatum*的根茎接种到附加KT (0.2 mg/L)、2,4-D (1 mg/L)、酪蛋白氨基酸(500 mg/L)、琼脂(0.5%)的改良MS培养基上诱导出的愈伤组织,经过8个星期的培养检测到鬼臼毒素的存在,其含量可达0.64%。研究者先后采取培

养条件的优化,高产细胞系的筛选,前体物质的饲喂,诱导子的添加等方法来提高悬浮系中目的次生代谢物——鬼臼毒素的产量。Woerdenbag将难溶的前体物质松柏醇(coniferyl alcohol)用β-环糊精助溶后添加到*P. hexandrum*的细胞悬浮系中,鬼臼毒素的产量得到明显的提高^[10]。同时,还发现添加前体物质松柏苷(coniferin)可使鬼臼毒素的产量增加12.8倍,但是松柏苷本身就是桃儿七的次生代谢产物,成本过高。当添加去氧鬼臼毒素9 d后,鬼臼毒素的最大含量可达到2.87%,最高转化率可达33.2%^[11]。在*P. hexandrum*细胞悬浮培养过程中,细胞活性、生物量和次生代谢物的产量常常随着培养基的褐化、细胞的聚集和pH值的下降而降低。Chattopadhyay报道果胶酶可以防止*P. hexandrum*细胞聚集但不利于鬼臼毒素的积累。因此,在细胞悬浮培养初期加入1.5 mg/L的果胶酶,然后在从鬼臼毒素生产培养基中去除。还发现10 g/L的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)不但可以解决外植体褐化和培养基酸化等问题,而且还有利于细胞的生长和鬼臼毒素的生物合成^[12]。

4.4 应用生物反应器生产鬼臼毒素:应用生物反应器进行植物次生代谢物的生产是有可能性的。Saurabh等首次报道了应用3 L的搅拌式生物反应器进行*P. hexandrum*细胞培养生产鬼臼毒素的实验,结果表明:果糖代替蔗糖作为碳源,暗培养,均有利于鬼臼毒素的生物合成,搅拌器以100 r/min的转速足够满足细胞生长的需要。在批量生产22 d后,干细胞生物量和鬼臼毒素产量分别达到6.5 g/L和4.26 mg/L,总的生产率为每天0.19 mg/L,比在三角瓶中的生产率提高了27%^[13]。虽然利用生物反应器来生产植物次生代谢物的成本相对于农业生产的成本要高得多,但只要能筛选出稳定性好、生产率高的细胞系来,商业化生产价格昂贵的鬼臼毒素还是很有可能的。

4.5 其他途径:毛状根具有遗传稳定、生物合成能力强、生长快、药用成分含量高等特点,因此利用发根农杆菌感染桃儿七植株诱导毛状根再生,进行毛状根培养生产鬼臼毒素也是一条行之有效的办法。实验表明利用黄亚麻*Linum flavum* L.的毛状根培养生产5'-去氧鬼臼毒素要比细胞培养的产量高5~10倍,目前Giri等应用*P. hexandrum*的毛状根培养生产鬼臼毒素的研究也取得了一定的进展^[14]。

5 结语

目前,一种源于鬼臼毒素而研发的GL 331已进入人体II期临床试验中,GL 331的体内活性均比VP-16强,且能克服VP-16肿瘤细胞株的耐药性问题,而且合成步骤少,易于工业化生产,是一个极具抗癌潜力的化疗候选药物^[15]。但包括桃儿七在内的鬼臼类植物已经濒临灭绝。人们开始另寻鬼臼毒素的植物资源,发现柏科(Cupressaceae)和亚麻科(Linaceae)的一些植物也含有鬼臼毒素,但是含量均比较低,例如:桧柏的叶中鬼臼毒素的含量仅为0.002 5%。印度已经开展了*P. hexandrum*的大面积引种栽培研究,并建立了种质资源保存库。我国虽在长白山地区建立了自然保护区加强了对野生桃儿七资源的保护但这远远不够。在我国西

藏、云南等桃儿七原产地应建立桃儿七自然保护区来加强对野生桃儿七植物资源的保护。桃儿七的生长周期长,在自然条件下需 5~7 年的生长期,一旦采挖永不复生^[5]。因此,利用桃儿七的细胞培养进行鬼臼毒素的生产是条好的途径,但是工业化生产一时还难以实现。目前,鬼臼毒素的生物合成途径已基本掌握清楚,同时几种关键酶的编码也得到了克隆,并获得了重组蛋白^[16]。如果将植物细胞培养技术与代谢工程中的反义技术有机的结合起来,获得高产、稳产的细胞系,这样将会大大地加快应用桃儿七的细胞培养商业化生产鬼臼毒素的研究进程。

References

- [1] Xiao P G. *New ly Compiled Record of Chinese Materia Medica* (新编中药志) [M]. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2002
- [2] Ma S B, Hu Z H. A contribution to the geographical distribution and phylogeny of *Podophylloideae* (Berberidaceae) [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1997, 19(1): 48-46
- [3] Shang M Y, Li J, Cai S Q, *et al*. Studies on the chemical constituents of the fruit of *Sinopodophyllum henryi* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(8): 569-571
- [4] Xu Z Y, Ma S B, Hu C P, *et al*. The flora biology and its evolutionary significance of *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 1997, 15(3): 223-227
- [5] Ma S B, Xu Z Y, Hu Z H. A contribution to the reproductive biology of *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin* (西北植物学报), 1997, 17(1): 49-55
- [6] Prasad P. Impact of cultivation on active constituents of the medicinal plants *Podophyllum hexandrum* and *Aconitum heterophyllum* in Sikkim [J]. *Plant Genetic Res Newletter*, 2000, 124: 33-35
- [7] Nadeem M, Palni L M S, Purohit A N, *et al*. Propagation and conservation of *Podophyllum hexandrum* Royle: an important medicinal herb [J]. *Biol Conserv*, 2000, 92: 121-129
- [8] Shama T R, Singh B M, Shama N R, *et al*. Identification of high podophyllotoxin producing biotypes of *Podophyllum hexandrum* Royle from North-Western Himalaya [J]. *J Plant Biotechnol*, 2000, 9(1): 49-51
- [9] Moraes-Cerdeira R M, Burandt Jr C L, Bastos J K, *et al*. *In vitro* propagation of *Podophyllum peltatum* [J]. *Planta Med*, 1998, 64(1): 42-45
- [10] Woerdenbag H J, Van Uden W, Frijlin K, *et al*. Increased podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* cell suspension cultures after feeding coniferyl alcohol as a β -cyclodextrin complex [J]. *Plant Cell Rep*, 1990, 9: 97-100
- [11] Uden W van, Bouma A S, Bracht W J F, *et al*. The production of podophyllotoxin and its 5-methoxy derivative through bioconversion of cyclodextrin-complexed desoxypodophyllotoxin by plant cell cultures [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 1995, 42(1): 73-79
- [12] Chattopadhyay S, Srivastava A K, Bhojwani S S, *et al*. Development of suspension culture of *Podophyllum hexandrum* for production of podophyllotoxin [J]. *Biotechnol Lett*, 2001, 23: 2063-2066
- [13] Saurabh C, Srivastava A K, Bhojwani S S, *et al*. Production of podophyllotoxin by plant cell cultures of *Podophyllum hexandrum* in bioreactor [J]. *J Biosci Bioeng*, 2002, 93(2): 215-220
- [14] Giri A, Narasu M L. Production of podophyllotoxin from *Podophyllum hexandrum*: a potential natural product for clinically useful anticancer drugs [J]. *Cytotechnology*, 2000, 34: 17-26
- [15] Wu J H, Lee K H. Recent advances in discovery and development of natural products as anticancer and anti-HIV agents in United States [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(11): 1045-1049
- [16] Xia Z Q, Costa M A, Proctor J, *et al*. Dirigent-mediated podophyllotoxin biosynthesis in *Linum flavum* and *Podophyllum peltatum* [J]. *Phytochemistry*, 2000, 55(6): 537-549

螺旋藻多糖和藻胆蛋白的肿瘤防治作用及机制

陈新美¹, 梅兴国^{2*}

(1. 华中科技大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074; 2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 螺旋藻多糖和藻胆蛋白具有显著的肿瘤防治作用, 综合起来主要是对体外肿瘤细胞的抑制、动物肿瘤的防治及在临床上的应用 3 个方面, 其肿瘤防治作用的机制可能是作用于肿瘤发生的不同阶段及增强机体的免疫功能两个方面。

关键词: 螺旋藻; 多糖; 藻胆蛋白; 肿瘤防治作用

中图分类号: R 282.77; R 979.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0100-04

Anticancer activity and mechanism of polysaccharide and phycobiliprotein from *Spirulina platensis*

CHEN Xin-mei¹, MEI Xing-guo²

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

* 收稿日期: 2003-07-18

作者简介: 陈新美(1978—), 女, 山东省新泰人, 助教, 硕士, 研究方向为生物化学与分子生物学。Tel: (020)81340212

E-mail: chenxinmei@163.net

* 通讯作者