

## 转基因西洋参冠瘿组织生物合成熊果苷的研究

张章<sup>1</sup>, 陈敏青<sup>1</sup>, 任胜芳<sup>1</sup>, 赵昱<sup>2</sup>, 于荣敏<sup>1\*</sup>

(1. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632; 2. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310031)

**摘要:**目的 应用悬浮培养转基因西洋参冠瘿组织生物合成熊果苷。方法 向预培养 20 d 的西洋参冠瘿组织培养物中加入 60 mg/mL 对苯二酚溶液, 共培养 60 h 后终止转化; 通过 TLC 和 HPLC 方法检测产物, 使用柱色谱法分离纯化产物, 利用光谱数据对其结构进行鉴定。HPLC 定量分析熊果苷产生的动力学变化曲线。结果 产物同时在冠瘿组织培养物和培养基存在, 并经过提取、分离得到其纯品, 经理化性质和谱学方法将其鉴定为 4-羟基苯- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(熊果苷)。摩尔转化率在共培养 60 h 后达到最高(88.4%), 同时, 培养物和培养基中产物的量(63.69 mg/瓶, 1.86 mg/瓶)以及产物的分泌百分率都达到最高(2.92%)。结论 在国内外首次将转基因冠瘿组织用于生物转化系统并成功地得到具有多种药理活性的熊果苷。

**关键词:**熊果苷; 西洋参; 冠瘿组织; 生物转化

**中图分类号:**R282.6

**文献标识码:**A

**文章编号:**0253-2670(2006)05-0759-03

**Biosynthesis of arbutin from crown gall of transgenic *Panax quinquefolium***ZHANG Zhang<sup>1</sup>, CHEN Min-qing<sup>1</sup>, REN Sheng-fang<sup>1</sup>, ZHAO Yu<sup>2</sup>, YU Rong-min<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

**Abstract: Objective** To investigate the biosynthesis of arbutin by suspension culture of crown gall of transgenic *Panax quinquefolium*. **Methods** Hydroquinone in methanol (60 mg/mL) was added to the medium of the crown gall of *P. quinquefolium* after precultured for 20 d, then they were co-cultured for another 60 h. The product was isolated and purified by column chromatography and its structure was identified by physicochemical properties and spectroscopic data. The dynamic curve of biotransformation was investigated by quantitative analysis of arbutin with HPLC. **Results** The product could be obtained from both of the culture and medium, which was isolated and elucidated as 4-hydroxyphenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (arbutin). After co-cultured for 60 h, the mole conversion ratio of hydroquinone is 88.4%, the product contents in culture and medium are 63.69 mg/flask and 1.86 mg/flask, respectively, and the excretion ratio of arbutin reaches the highest (2.92%). **Conclusion** It's the first time around the world that the crown gall of transgenic *P. quinquefolium* is used as a biotransformation system and arbutin which shows varied pharmacological activities have been got successfully.

**Key words:** arbutin; *Panax quinquefolium* L.; crown gall; biotransformation

熊果苷(arbutin),即 4-羟基苯- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷,最初是由熊果等植物中分离得到的一种苷类化合物,作为美白剂广泛用于化妆品中<sup>[1]</sup>。1996 年 Daeda 报道了熊果苷具有抑制黑素细胞的酪氨酸酶活性,从而阐明了熊果苷的美白作用机制<sup>[2]</sup>。2003 年,我国学者又证明了该成分具有显著的镇咳、祛痰和平喘作用<sup>[3]</sup>,有希望研制开发成为一种新的呼吸系统治疗药物。

生物转化是利用生物体系产生的酶对外源化合物进行的酶催化反应<sup>[4,5]</sup>。通过文献及专利查阅发

现,目前用于生物合成/转化的植物培养系统很多,包括愈伤组织(callus)、培养细胞、转基因毛状根(hairy root)等,但迄今尚未发现利用转基因冠瘿组织(crown gall)进行天然药物活性成分的生物合成与生物转化的文献报道<sup>[5]</sup>。

转基因冠瘿组织具有生长迅速、不需加入外源激素、遗传性状稳定等特点<sup>[6]</sup>。笔者首次利用本室诱导获得的西洋参冠瘿组织生物转化对苯二酚,并成功地获得了熊果苷。本实验报道转化产物熊果苷的分离、鉴定,同时考察了熊果苷转化的动力学过程。

收稿日期:2005-07-21

基金项目:教育部科技计划重点项目(104180);广东省自然科学基金项目(31891);广东省中医药局科研项目(103041)

作者简介:张章(1980—),男,安徽人,硕士在读,研究方向为天然药物活性成分的生物合成与生物转化研究。

E-mail: zzmoxue@163.com

\*通讯作者 于荣敏 Tel: (020) 85221469 E-mail: tyrm@jnu.edu.cn

## 1 材料与试剂

1.1 仪器与试剂: HZTZ 双层震荡器为哈尔滨市东联电子技术开发有限公司生产; W-CJ-IF 型净化工作台为苏州净化设备厂产品; 上海申安医疗器械厂 LDX-40BI 型立式自动蒸气灭菌器; Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪, ZORBA × Agilent 1100 色谱工作站, SB C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 薄层色谱采用青岛海洋化工厂生产的 GF254 硅胶; X-4 数字显示显微熔点测定仪由北京泰克仪器有限公司生产。NMR 在 Bruker Advance 400 MHz 核磁共振波谱仪上测定, TMS 为内标; 质谱在 Finigan LCQ 质谱仪上测定。

1.2 药品(底物): 对苯二酚, 杭州市华东医药有限公司, 分析纯。用前以甲醇溶解, 配成 60 mg/mL 的溶液。

熊果苷对照品购自中国药品生物制品检定所。

## 2 实验方法

2.1 西洋参冠瘿组织的培养: 西洋参冠瘿组织<sup>[6]</sup>培养于装有 100 mL MS 基本培养基(不含激素)的 250 mL 三角瓶中, 于黑暗条件下 25 °C 震荡培养, 摇床转速为 110 r/min。培养基 pH 5.7, 121 °C 灭菌 20 min。每 20 d 继代一次, 每瓶接种冠瘿组织(鲜重) 5 g。

2.2 生物转化方法: 西洋参冠瘿组织在上述培养条件下预培养 20 d, 然后无菌条件下加入 60 mg/mL 的对苯二酚甲醇溶液 0.5 mL, 共培养 60 h。同时在另一培养瓶中加入 0.5 mL 的甲醇(不含对苯二酚)作为对照。

2.3 转化产物的检测: 将添加底物的冠瘿组织再培养 60 h 后, 抽滤, 分别获得冠瘿组织培养物和培养基; 培养物用蒸馏水冲洗干净, 洗液与培养基合并。培养物 50 °C 条件下烘干 36 h, 乳钵捻成粉末状, 称取 0.01 g 培养物用 5 mL 甲醇室温冷浸提取 48 h, 提取液分别用于 TLC 和 HPLC 检测。培养基 55 °C 减压浓缩至适量, 等体积醋酸乙酯、正丁醇分别萃取 3 次, 正丁醇部位减压蒸干, 甲醇溶解残渣以供 TLC 和 HPLC 检测。

按上述方法平行处理对照组培养物, 分别获得培养物甲醇提取液和培养基正丁醇萃取物的甲醇溶液。

TLC 检测条件参考文献报道<sup>[7]</sup>。HPLC 检测条件: 流动相为 2% 乙腈-水; 体积流量为 0.8 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 280 nm; 进样量 2 μL。

2.4 转化产物的分离纯化: 本实验共用 150 mg 底物, 分别加到 5 瓶预培养 20 d 的西洋参冠瘿组织培

养瓶中, 共培养 60 h。培养物甲醇冷浸提取物用温水混悬, 然后用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇依次萃取。将正丁醇萃取部分于 55 °C 减压蒸干, 甲醇溶解残渣, 100~200 目硅胶拌样, 300~400 目硅胶装柱, 行硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇 (90:10; 85:15; 80:20; 70:30) 梯度洗脱; 合并 80:20 洗脱部分, 减压蒸干。甲醇溶解残渣, 上 Sephadex LH 20 柱, 甲醇洗脱, 合并相同部位, 经甲醇重结晶, 得到白色针状结晶(I) 37 mg。

取滤除西洋参冠瘿组织后的培养基, 以正丁醇萃取, 依上法处理正丁醇萃取物, 得到白色针状结晶(I) 2.1 mg。

2.5 西洋参冠瘿组织生物合成熊果苷的动力学曲线: 精确控制接种量, 向 8 瓶预培养了 20 d 的西洋参冠瘿组织培养瓶中分别加入 60 mg/mL 对苯二酚甲醇溶液 0.5 mL, 培养条件同上。分别于加入底物后 12、24、36、48、60、72、84、108、132 h 取出 1 培养瓶终止转化。抽滤获得培养物和培养基, 培养物用少量蒸馏水冲洗干净, 洗液与培养基合并。培养物处理同 2.3。培养基用蒸馏水定容到 100 mL, 然后取出 10 mL 于 -4 °C 保存备 HPLC 定量分析。HPLC 条件同 2.3。

## 3 结果

3.1 转化产物的检测: TLC 检测结果见图 1。在实验组培养物和培养基中均检测到一个新的斑点。R<sub>f</sub> 值和熊果苷标准品相同, 均为 0.55, 与熊果苷共薄层为同一斑点。

HPLC 检测结果见图 2。在实验组培养物提取物中出现一个新峰, 保留时间为 8.416 min。

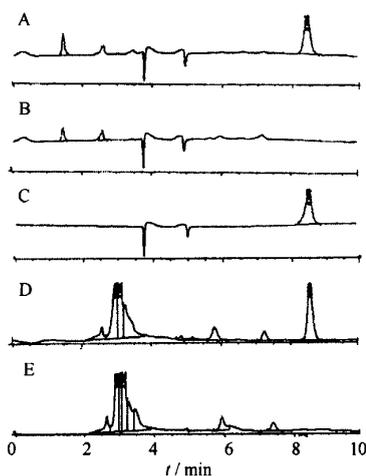
3.2 产物的结构鉴定: 白色针状结晶 I (甲醇), mp 199~200 °C, Molish 反应阳性, 说明化合物 I 为一糖类或苷类成分。IR (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 1 013, 1 074, 1 220, 1 459, 1 513, 2 895, 2 911, 3 377; UV  $\lambda_{\max}$  (nm, MeOH): 286, 223; MS  $m/z$ : 295 [M + Na]<sup>+</sup>。由上可知, 化合物 I 为一苷类成分, 苷元为苯环, 相对分子质量 272。

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 3.34 - 3.85 (m, 6H), 4.83 (d, 1H,  $J=7.40$  Hz), 6.91 (d, 2H,  $JP=5.92$  Hz), 7.1 (d, 2H,  $J=5.90$  Hz)。<sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 150.2 (C-1), 115.8 (C-2, C-6), 118.4 (C-3, C-5), 151.2 (C-4), 101.5 (C-1'), 73.2 (C-2'), 76.0 (C-3'), 68.6 (C-4'), 74.7 (C-5'), 60.4 (C-6')。由<sup>1</sup>H-NMR 和<sup>13</sup>C-NMR 所提供的数据表明, 结晶 I 存在对二取代的芳环, 芳环的 4 个氢组成



1-对照培养基正丁醇萃取物 2-实验培养基正丁醇萃取物  
3-熊果苷对照品 4-实验培养物甲醇提取物  
5-对照培养物甲醇提取物  
1-n-BuOH extract of control medium group 2-n-BuOH extract of experimental medium group 3-arbutin reference substance  
4-MeOH extract of experimental culture group 5-MeOH extract of control culture group

图 1 西洋参冠瘿组织生物合成熊果苷的 TLC 图谱  
Fig. 1 TLC Chromatogram of arbutin biosynthesis by crown gall of *P. quinquefolium*

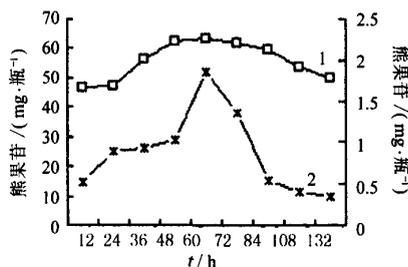


A-实验培养物甲醇提取物 B-对照培养物甲醇提取物 C-熊果苷对照品 D-实验培养基 E-对照培养基  
A-MeOH extract of experimental culture group B-MeOH extract of control culture group C-arbutin reference substance  
D-experimental medium group E-control medium group

图 2 西洋参冠瘿组织生物合成熊果苷的 HPLC 图谱  
Fig. 2 HPLC Chromatogram of arbutin biosynthesis from crown gall of *P. quinquefolium*

A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>系统,成苷的糖为 β-D-吡喃葡萄糖苷。

3.3 西洋参冠瘿组织生物合成熊果苷的动力学曲线:在 12~132 h 内,西洋参冠瘿组织对对苯二酚生物转化的动力学曲线见图 3。在加入底物后第 60 h,每瓶培养物和培养基中熊果苷量达到最高,分别为 63.69 和 1.86 mg;熊果苷分泌进入培养基的比例达



1-产物在培养物中的量 2-产物在培养基中的量  
1-content of product in culture 2-content of product in medium

图 3 西洋参冠瘿组织生物合成熊果苷的动力学曲线  
Fig. 3 Dynamic curve of arbutin biosynthesis from crown gall of *P. quinquefolium*

到最高,为 2.92%。总摩尔转化率达到 88.4%。

#### 4 讨论

本研究使用悬浮培养转基因西洋参冠瘿组织作为生物合成/转化系统,国内外均未见文献报道。

冠瘿组织培养系统与愈伤组织/细胞培养比较具有倍增速度快、培养条件简单(不需加入外源激素)、遗传性状稳定等优点,非常适合于天然药物活性成分的生物合成与生物转化研究,以及天然药用成分的大规模生产。

本研究还发现,熊果苷在西洋参冠瘿组织培养物和培养基中均有分布。其中熊果苷量的动力学曲线说明了由于冠瘿组织中水解酶酶活的变化而导致的产物量的上升或下降,这提示应该选择合适的共培养周期和收获时间以减少产物的酶解。此外,培养基中熊果苷同比下降也可能是由于培养后期偏酸的培养基条件对其有一定的水解作用。

#### References:

- [1] Yao B, Shen X L, Pan Y J. Progress of α-arbutin [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学杂志), 2005, 22 (1): 32-33.
- [2] Maeda K, Fukuda M. Arbutin; mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture [J]. *Pharmacol Exp Ther*, 1996, 276(2): 765-769.
- [3] Wang Y F, Zhou Y H, Zhang J J. Pharmacodynamics of arbutin on relieving cough, dispelling phlegm and preventing asthma [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (8): 739-741.
- [4] Kohji I, Hiroki H, Toshifumi H, et al. Biotransformation using plant cultured cells [J]. *J Mol Catal B; Enzym*, 2003, 23: 145-170.
- [5] 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.
- [6] Yu R M, Song Y B, Zhang H, et al. Study on the culture of crown gall from *Panax quinquefolium* and the production of its secondary metabolites—ginsenosides Re and Rg1 [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2003, 19(3): 372-375.
- [7] Zhao M Q, Ding J Y, Liu J, et al. Studies on the arbutin biosynthesis by hairy root of *Panax ginseng* C. A. Mayer [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26 (12): 819-822.