

• 中药现代化论坛 •

天然药物活性成分的生物合成与生物转化

于荣敏

(暨南大学药学院, 广东 广州 510632)

摘 要:生物活性成分是中药防病治病的物质基础,也是中药现代化研究的重要内容之一。生物合成与生物转化以其公认的高效和高选择性的温和催化体系的特征正在中医药学等学科领域发挥着越来越重要的作用。探讨了天然药物活性成分的生物合成和生物转化与中药现代化的关系及其诸多应用(尤其中药和天然药物研究),并进行了探索性展望。

关键词:天然药物;活性成分;生物合成;生物转化

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)09-1281-08

Biosynthesis and biotransformation of biological active constituents from natural medicines

YU Rong-min

(College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Bioactive constituent is the substantial basis of treatment for various diseases by Chinese materia medica (CMM) and also one of the most important substances for the modernization of CMM. Biosynthesis and biotransformation are considered to be one of the mild systems in bio-catalysis with optimal efficiency and selectivity, which play more potential role in the field, such as traditional Chinese medicine. To review and discuss some applications of biosynthesis and biotransformation in the research of CMM and natural medicines and their relationship of modernization of CMM as well. Moreover, a prospect is given exploringly.

Key words: natural medicines; active constituents; biosynthesis; biotransformation

生物催化体系是迄今为止人类所知的最高效和最具有选择性的温和催化体系。生物体中的酶以远远超出人们想像的速度催化各种生化反应。酶不仅在生物体内,也能在生物体外促进天然的和人工合成的化学分子的诸多转化反应,并且显示出优良的化学选择性、区域选择性和立体选择性。因此生物合成和生物转化提供了许多常规化学方法不能或不易进行的化合物合成方法。众多研究结果表明,利用生物合成和生物转化方法可以合成和制备许多包括光学纯的医药产品及中间体在内的复杂的功能化合物。绝大多数的生物合成和生物转化反应所需的条件非常温和,而且反应产物单一。从本质上讲他们是一个与环境友善的绿色化学过程。该方法不但经济效益明显,而且对环境及社会发展,对绿色工业的建立都具有重要的战略意义。

植物的次生代谢产物如生物碱、香豆素、芳香类

物质、类固醇以及萜类等是药物、香料、色素、农药以及食品添加剂等的重要来源。由于高等植物细胞中的次生代谢产物量很低且有些产物不能或难于通过化学合成途径得到,因此,人们期望能够充分利用植物细胞培养以及植物酶对外源底物进行转化,得到目标化合物。许多利用植物细胞和酶系统进行的生物转化具有部位以及立体特异性,其反应类型包括氧化反应、还原反应、羟基化反应、甲基化反应、乙酰化反应、异构化反应、糖基化反应以及酯化反应等。随着基因操作技术的进步,生物转化具有更大的潜力来克隆和表达目标酶的外源基因,从而促进其产物的合成。

1 天然药物活性成分的生物合成

生物合成(biosynthesis)为生物体内进行的同化反应的总称。其具有如下几种不同的生理意义:

(1)合成生长增殖所必需的物质;(2)在稳定状态时,

合成用于补充消耗掉的成分的物质；(3)为长期和短期的贮藏,进行必要的合成。一般来说,生物合成是吸能反应,多数是朝向使分子结构复杂化的方向进行。所需能量多由 ATP 供给,也有通过 GTP(如蛋白质合成)、UTP(如糖合成)、CTP(如磷脂的合成)和还原型辅酶(如脂肪链的延长)等提供。生物合成可分为由主要原料进行的全合成(从头合成,如光合作用)和由部分分解产物进行可逆性的废物利用途径(如嘌呤核苷酸的转换)。生物体内的各种生物合成途径之间多受到复杂的控制。

天然药物活性成分生物合成研究的主要目的是探讨生物体中次级代谢产物的生源途径,研究从前体经各个中间体直至形成最后产物的历程,以及有关的反应机制,进而用生物方法实现难以用一般化学方法完成的某些反应,进一步为现代药物化学的新药先导化合物的发现提供一仿生的研究手段,也为天然药物生物资源的可持续发展和利用提供新的研究途径^[1]。

结构类型众多的天然药物活性成分多来源于为数不多的基本反应和原料。大多数反应是由酶催化的,酶的功能只是催化,故生物合成中的反应是符合有机化学反应机制的。初级代谢形成的数百个化合物中也仅有几个但却是构成成千上万个活性成分的原料,如乙酸、芳香氨基酸及脂肪氨基酸等。

此外,尽管现代波谱学技术和 X 射线单晶衍射的广泛应用使得天然药物化学成分的鉴定受益匪浅,但对有机化学家来说,利用天然产物的生源学说不仅可以大大节省结构鉴定的时间和费用,而且也可为新化学反应及其机制的阐明提供非常有价值的信息。

天然药物活性成分均由一定的基本结构单位按不同方式组合而成。常见的基本结构有以下几种类型: C_2 单位(乙酸单位):如脂肪酸、酚类、苯醌等聚酮类化合物; C_5 单位(异戊烯单位):如萜类、甾类等; C_6 单位:如香豆素、木质素等苯丙素类化合物;氨基酸单位:如生物碱类化合物;复合单位:是上述单位复合构成。主要生物合成途径有:(1)乙酸-丙二酸途径(acetate-malonate pathway, AA-MA 途径):脂肪酸类、酚类、蒽醌类等化合物均由该途径生成。(2)甲戊二羟酸途径(mevalonic acid pathway, MVA 途径):主要生成萜类化合物。但须注意的是,萜类化合物中也有与异戊烯法则不相符合的,这些化合物多在环化过程中伴随着重排反应的发生。由于 MVA 也是由乙酰辅酶 A 出发生成,故其生物合

成基源也可以认为是乙酰辅酶 A。(3)桂皮酸途径(cinnamic acid pathway)及莽草酸途径(shikimic acid pathway):苯丙素类及黄酮类化合物均由此途径生成。(4)氨基酸途径(amino acid pathway):是天然药物中众多生物碱类成分生物合成的途径。

1.1 植物细胞培养物中活性成分的生物合成:自从 1939 年人们用实验方法建立了植物细胞和器官培养技术以来,植物细胞培养技术现已发展成为一门精细的实验科学。许多天然药物的活性成分是植物的次生代谢产物,因而利用植物细胞培养技术生产这些化合物已经发展成为现代生物技术研究的主要内容之一。从植物培养细胞和组织中分离得到的活性成分主要有苯丙素类、生物碱、萜类、醌类及黄酮类化合物等。就细胞培养而言,理论上均可以通过基因工程以及改变培养环境和培养策略等手段,对次级代谢产物的单体分布比例进行调控。基因工程方法是提高次级代谢产物量的有效方法,但是目前对多样性次级代谢产物生物合成的研究,尤其是修饰母体结构生成不同的代谢产物的有关酶的报道还很少,故利用基因工程的手段来调节细胞培养过程中多样性次级代谢产物的合成任重道远。

植物细胞培养技术与种植方式相比,具有如下优点:(1)活性成分的生产可在人为控制条件下进行,可以极大地提高生产率;(2)培养可排除病菌和虫害的侵扰,便于控制质量;(3)通过对有效成分合成路线进行遗传操作,可达到提高生物量的目的;(4)培养细胞也可产生原植物不存在的新化合物;(5)对培养细胞产生的中间产物进行酶促合成或化学合成,可获得所需目的产物。同时,也保护了珍贵的药用植物资源,如名贵中药藏红花 *Crocus sativus* L. 具有很强的活血化瘀功效,还具有良好的抗癌活性,而且低毒无副作用。藏红花培养细胞中产生的抗癌活性成分藏红花素 A(crocin A)是人工栽培藏红花的 2~3 倍,故可大大改善藏红花有效成分量低的问题。张秀省等^[2]以长春花叶和子房诱导的愈伤组织为实验材料,对 4 种不同愈伤组织的生长、吲哚生物碱组分、阿玛碱、长春酯碱的生物量进行分析比较,发现用长春花不同器官作为外植体培养出的愈伤组织中吲哚生物碱的量有明显差异,从而为今后提高植物药用成分的量的研究提供了一条新途径。因此,在药用植物的栽培研究和大力实行 GAP 管理的同时,充分发挥植物组织培养、细胞培养以及器官培养等现代生物技术方法的优势和特点是实现中药现代化的可行之路。

1.2 生物碱的生物合成:生物碱是含氮有机化合物中最大的一类次生代谢物质,主要包括异喹啉类、吲哚类和多炔类等结构类别。

长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 中含有多种生物碱,其中包括具有抗癌作用的长春花碱和长春花新碱,这两种化合物属于吲哚类生物碱。人们已从该类生物碱中发现了许多活性成分。吲哚生物碱的生物合成有两条途径:莽草酸途径(吲哚途径)和甲羟戊酸途径(萜类途径),其生物合成前体异胡豆苷(strictosidine)是由色胺和裂环马钱子(secologanin)缩合形成的,催化此反应的是异胡豆苷合成酶(strictosidinesynthase,STR)。有报道^[3]将 STR 标定在烟草植物不同的亚细胞区室-叶绿体、液泡和内质网中表达,通过蛋白免疫印迹分析和 STR 酶活性的测定,表明 STR 可在叶绿体、液泡和内质网中有效表达。这表明了次生代谢产物在细胞内和细胞间的路径选择对吲哚生物碱的合成来说是相当重要的一个方面。通过细胞培养、组织培养及毛状根的培养分析了长春花生物碱合成的关键步骤,结果发现长春花碱和长春花新碱合成的主要障碍在于缺乏文多灵的积累,从而导致文多灵与长春质碱的偶合障碍而不能生成用于抗癌的长春花碱和长春花新碱,此障碍一旦突破,则用生物技术方法合成长春花碱和长春花新碱将具极大的应用开发价值。

1.3 萜类化合物的生物合成:萜类化合物都是从异戊二烯基二磷酸(IPP)和二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)聚合而成的。IPP 在 IPP 异构酶的作用下形成 DMAPP,IPP 和 DMAPP 在异戊烯基转移酶的作用下形成 geranyldiphosphate(GPP)。Farnesyldiphosphate(FPP)和 geranylgeranyldiphosphate(GGPP)为非环化的中间体,在萜类合酶(Tps)的作用下形成各类萜类物质(单萜来自于 GPP,倍半萜来自于 FPP,二萜来自于 GGPP)^[4]。

紫杉醇属于二萜类化合物,是一种优良的抗肿瘤药物。沿着异戊二烯代谢途径,从异戊二烯焦磷酸到紫杉醇的最后合成,大致可以分为 3 个阶段:紫杉烷骨架的形成、紫杉烷碳骨架的官能团化和紫杉醇侧链的生物合成。赵春芳^[5]利用茉莉酸甲酯(MJ)诱导红豆杉细胞培养物,比较各个组分在诱导前后的相对色谱峰面积变化,发现所有的紫杉烷组分的浓度在诱导后都有不同程度的提高,提示 MJ 对紫杉醇合成中非有效乙酰化旁路代谢有促进作用,而对 C₁₄位取代物生成的旁路促进作用不明显,这为紫杉醇的生物合成研究提供了新的思路和方法。

刘峻等^[6]提取黄瓜炭疽病菌 *Colletorichum lagnarinm*、青菜炭疽病菌 *Phoma filtrate*、棉花枯萎病菌 *Fusariumoxy sponum*、黑曲霉 *Asperillus niger* 中的真菌诱导子与人参毛状根共培养,在分析测定后发现真菌诱导子对人参毛状根某些皂苷的合成具有特异性,同时也影响人参毛状根的生物量。如将培养液中黑曲霉多糖诱导子增加到 20 mg/L 时,总人参皂苷可增至 3.649%。尽管单体人参皂苷 Rg₁ 和 Re 未检出,但人参皂苷 Rg₂ 和 Rb₁ 的量却有明显增加,并可促进人参毛状根的生长。上述结果表明:培养过程中添加外源性诱导子,有利于人参毛状根次生代谢产物的定向积累。

1.4 黄酮类化合物的生物合成:黄酮类化合物是指以 C₆-C₃-C₆ 碳骨架为基本单位构成的一大类化合物的总称,这类含有氧杂环的化合物多存在于高等植物和羊齿类植物中,其众多结构类型则是由于母核上各取代基(如羟基、羟甲基等)的数量和位置不同所致。黄酮类化合物的基本骨架是由 3 个丙二酰辅酶 A(malonyl CoA)和 1 个桂皮酰辅酶 A(cowanoyl CoA)生物合成而产生的。

方从兵等^[7]以野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 悬浮细胞为实验体系,进行了不同前体化合物和相关中间代谢产物的饲喂实验,以及相关酶学证据的研究。结果表明:采用对羟基苯丙酮酸和对羟基苯丙乳酸的处理同样有助于野葛培养细胞中异黄酮化合物的合成和积累,且单位细胞干重的黄酮产率有更大程度的提高;同时在野葛培养细胞中均可检测到对羟基苯丙酮酸还原酶和对羟基苯丙乳酸脱水酶的活性。因此,可推测对羟基苯丙酮酸和对羟基苯丙乳酸可能也是黄酮生物合成的前体化合物,并且植物黄酮类化合物生物合成可能存在另一条新的途径,即黄酮类化合物生物合成的直接前体香豆酸是以预苯酸为前体化合物,越过了苯丙氨酸和桂皮酸(或肉桂酸)的中间代谢过程,经对羟基苯丙酮酸和对羟基苯丙乳酸而合成的。

植物次级代谢是一个公认研究难度大,但又极具研究价值的领域。次级代谢一般只限定在特定组织和器官内,同时多数仅在植物生活环境的特定时期才出现,且大多受到光照、温度、营养等生育条件的影响。由于生物的多样性以及植物次生代谢自身的复杂性,使得植物次生产物的生物合成途径往往呈现出多样性的特点,故各类化合物的生物合成均有发现新途径的可能性。随着植物基因工程的发展,植物代谢途径基因的发现、克隆、转化及表达工作的

飞速发展,对次生代谢的途径和机制研究也从原有的单点代谢转到现在的多点代谢,从通过调节单个酶的表达来调控代谢途径到通过调节几个酶的表达来调控代谢途径等。相信随着研究工作的不断深入,植物次生代谢基因工程必将为人类更好的利用植物资源做出更大的贡献,为人类提供更多有效的药物和有利的经济资源。

2 天然药物活性成分的生物转化

一般认为,现代生物转化研究始于巴斯德时代,但微生物转化技术的工业化则始于 20 世纪 50 年代人们利用微生物对甾体化合物的结构改造。其后,该项技术由于相关产业的资金支撑和潜在的巨大商机而取得了较快的发展。

生物转化技术的发展一般分为 4 个重要阶段,即大规模膜分离、酶和细胞的固定化、重组 DNA 技术和双相生物催化系统的应用。生物转化和生物催化技术是现代生物技术的重要组成部分,同时也在化学领域发挥着愈来愈重要的作用。被人们广泛应用于医药、食品、精细化工等行业中。其中,尤以微生物整体细胞或分离酶为反应催化剂的生物转化和生物催化技术以其反应周期短、专一性强、条件易控、易于放大等优点而受到青睐,成为生物转化技术中发展最迅速的分支之一。而现代提取、分离和结构鉴定技术的进步,又拓宽了该技术的应用范围。目前,生物转化技术已在小分子化合物的转化、天然化合物的生物合成、药物前体化合物的转化、生物催化的有机化合物不对称合成、活性成分筛选及新药开发、药物代谢研究等领域得到广泛应用。

生物转化(biotransformation, bioconversion),也称生物催化(biocatalysis),是指利用植物离体培养细胞或器官、动物、微生物及其细胞器等对外源化合物进行结构修饰而获得有价值产物的生理生化反应,其本质是利用生物体系本身所产生的酶对外源化合物进行酶催化反应。它具有反应选择性强(立体选择性、位置选择性)、反应条件温和、副产物少、不造成环境污染和后处理简单等优点,并且可以进行传统有机合成不能或很难进行的化学反应。生物转化与生物合成(biosynthesis)不同,后者是指利用整体细胞、器官和机体中简单的底物合成复杂化合物的过程。它们又和生物降解(biodegradation)不同,在生物降解中,复杂的底物被分解为简单物质。

作为生物催化剂,植物细胞培养具有下列优点:

①可以在实验室中生长,重现性好;②细胞可以无限制的生长,培养物可以大量累积,从而源源不断的提

供生物材料;③生长循环周期短,有利于实验的进行。因此,人们把植物细胞培养与微生物(如酵母、真菌以及细菌等)等一样广泛用于生物转化。

与微生物及其产生的酶进行的生物转化相比,植物生物转化系统的独特之处在于植物中具有许多微生物中不存在的独特的酶,它们可以催化一定的反应,生成许多复杂的化合物,甚至是新化合物,而用化学的方法来合成这些化合物步骤烦琐且费用昂贵。因此利用植物细胞及从植物细胞中分离出的酶来进行药物生产或新药研制开发具有极大潜力。

自然界中存在许多可以进行生物转化的化合物,如芳香族化合物、类固醇、生物碱、香豆素、萜类、木脂体等。不过,利用植物进行生物转化的化合物的潜力,在植物细胞培养中,一些重要的次生代谢产物并不局限于植物在其代谢过程中产生的中间体,也可以是人工合成的化合物。

植物细胞培养具有巨大的产生特定次生代谢产物的潜力,在植物细胞培养中,一些重要的次生代谢产物并不形成和累积。但是,这样的培养物却保留了将外源底物转化为有用产物的能力。植物悬浮细胞培养、固定化细胞培养、毛状根培养以及酶都可以通过生物转化产生有用化合物。生物转化既可产生新的化合物,又可改造或修饰已有的化合物,或增加目标产物的产量以及克服化学合成的缺点等。更重要的是,植物细胞和器官培养由于催化多步反应常常会产生中间体代谢产物,有助于人们阐明化合物的生物合成途径。而且催化反应可以在比较温和的环境下进行,副产物较少、耗能少、安全及减少开支等。此外,植物生物转化系统还可以与有机合成结合应用而相得益彰。

2.1 植物细胞和器官培养物的生物转化:许多因素都能够影响植物细胞和器官培养物进行生物转化,如前体物的溶解性、细胞通透性、有活性的酶量、酶的存在位置、副反应的存在、诱导作用、pH 值变化以及渗透作用等。有些物质难溶或者不溶于水,因此其转化速率非常低,通过引入环糊精(cyclodextrin)可以使这些物质更容易进行生物转化。环糊精是一个环状寡聚糖,能够与各种各样的非极性配基形成极易溶于水的稳定的包合物(inclusion complexes)。有机相的存在会在很大程度上影响植物细胞的生存,因此在这些系统中酶的活性可能会有所降低,而环糊精复合物的形式使得这些前体物质的物理性质包括它们在水中的溶解性改进了,因而更容易进行生物转化。有机溶剂如异丙醇、二甲亚砜(DMSO)和

多糖(如壳聚糖)都可能增大细胞的通透性,从而促进底物摄取及产物释放。其他增大细胞通透性的方法还有超声波降解法、电极法和电泳释放以及高电场脉冲和超高压等。

并非所有在植物细胞中产生的物质都依赖于酶的催化反应。如含有几个立体活性中心的生物碱 *nitraramine*, 在东篱 *Nitraria schoberi* L. 中就以消旋体的形式存在。手性代谢产物的分离可能是一种自然的非酶反应,首先生成非手性前体,然后对其中的一个对映体进行酶催化代谢。

植物细胞培养和毛状根培养所进行的生物转化为具有生物活性的化合物的结构改造提供了一种重要工具。但是,悬浮培养的最大缺点就是体细胞克隆不稳定,为了维持高产就必须持续不断的筛选细胞株,利用组织(如芽和根)进行培养时也存在这一问题。而通过土壤中的发根农杆菌进行生物转化所得到的转基因毛状根,与植物细胞悬浮培养相比其生长速度更快,无须添加外源生长素,而且由于其属于器官培养,具有分化性,其遗传稳定性增加,因此其代谢产量也非常稳定。由于具有这些优势,许多曾经一度被认为不可能通过细胞培养进行生产的一些来源于根的产物都利用毛状根培养技术重新进行了研究。许多因素也可能影响毛状根的药用次生代谢产物的产生,如营养成分、诱导子、产物生物转化的前体以及对发根农杆菌 *Ri* 质粒的遗传改造等。

近年来,我国科学家们也对利用植物细胞、转基因组织等生物转化药用活性成分给予了极大的关注,并取得可喜成果。如周立刚等^[8]在露水草 *Cyanotis arachnoidea* C. B. Clarke 毛状根培养系中加入青蒿素,培养 8 d 后,青蒿素转化为去氢青蒿素。赵明强等研究了人参毛状根生物合成熊果苷的基本条件,以熊果苷的量、氢醌的转化率为指标,对培养 22 d 的人参毛状根更换含底物的 B5 培养基后,对浓度为 2 mmol/L 的氢醌持续转化 24 h,所合成的熊果苷占干重的 13.0%,转化率达 89%。

科学家们在生物转化途径方面的研究则主要表现在植物特征性的生物合成途径或使用了正常的生物合成途径的中间产物。Kreis 等研究了毛花洋地黄培养物中有关成分的生物转化。由 *digitoxigenin* 转化而成的 *digitoxin* 及其衍生物 *digoxin* 均可用于心血管疾病的治疗,其中,后者尤为重要,但其在植物中的量却较前者低。在此转化过程中,约 80% 的 *digoxin* 可分泌到培养基中。研究发现,*digitoxin*-12 β -羟基化酶扮演了重要角色。此外,转化过程中还

生成了许多强心苷类成分,如葡萄糖苷、甲基葡萄糖苷、海藻糖苷及毛地黄毒糖苷等单糖苷类化合物。

植物细胞培养物具有对外源底物进行生化转化的能力。人们选择不同类型的生物催化剂及底物来考察这些反应的部位特异性、立体特异性以及对映选择性和底物特异性。反应类型以及反应的立体化学是由底物的官能团以及官能团附近的结构片段决定的。因此,通过植物细胞培养物进行生物转化被认为是一种可以对分子进行结构修饰而使其成为活性化合物的工具。比较重要的生物转化类型有:羟基化反应、糖基化反应、氧化还原反应、水解反应、环氧化反应、羰基还原反应、碳碳双键的还原反应、硝基还原反应。

2.1.1 羟基化反应:植物细胞培养物通过在分子中的不同部位进行立体选择性氧化反应转化外源底物。这些细胞具有部位特异和立体特异性羟基化烯丙位 C=C 双键的能力,以及区别底物的不同对映体并选择性地对其中之一进行羟基化的能力。如长春花的细胞悬浮培养物可将香叶醇、橙花醇以及左旋和右旋香芹酮通过其戊基侧链羟基化为一系列的单羟基化异构体,其中包括转化为抗真菌代谢物 5 β -羟基新二羟基香芹醇。杨林等^[9]利用商陆培养细胞对 6 β -santonin 进行选择性的还原及羟基化反应,可为其进一步化学结构改造提供有价值的中间体。

2.1.2 糖基化反应:糖基化反应可以使得许多外源化合物的理化性质与生物活性发生较大的变化,例如将不溶于水的化合物转变为水溶性化合物,这一点是微生物培养或化学合成很难做到的。糖基化反应主要有两种:一种是在羧酸和糖片段之间发生酯化反应,另一种是羟基和糖片段之间的糖基化反应。丁酸具有体外抑制肿瘤生长和诱导肿瘤细胞分化的作用,但是其在哺乳动物系统中半衰期很短,人们通过悬浮培养的灰叶烟草 *Nicotiana glauca* Viv. 细胞糖基化得到其糖苷,半衰期大大增加,有希望开发为抗癌新药。

2.1.3 氧化还原反应:通过植物细胞培养可以将醇转化为相应的酮。对于一些手性化合物的生产来说,对映选择性氧化反应是非常有用的。长春花细胞悬浮培养物可选择性地氧化和还原脱氢表雄酮的 C₃ 和 C₁₇ 位,使其转化为 androst-4-ene-3,17-dione 和 17 β -hydroxyandrost-4-en-3-one^[10]。

2.1.4 水解反应:在水解反应中,人们对醋酸盐水解了解较多。对映选择性水解可用于外消旋醋酸盐的光学鉴定。

2.1.5 环氧化反应:环氧化反应可以用于具有细胞毒性的倍半萜烯的结构修饰。莪术 *Curcuma zedoaria* (Christm.) Rosc. 细胞悬浮培养物中大根香叶酮(germacrone)的环氧化反应就是成功的实例之一。

2.1.6 羰基还原反应:在植物细胞培养中有很多关于酮和醛经过还原反应生成相应的醇的报道。在该反应中,使羟基化合物在具羟基的部位具有手性。*Nicotiana glauca* L. 或长春花细胞悬培养中得到的全细胞、细胞提取物或者培养液都能够实现这一反应,这要归因于其过氧化物酶分泌到培养基中。在合适的条件下,大约 87% 的底物可在 40 min 内转变为目标产物。

2.1.7 C=C 双键的还原反应:长变胞藻 *Ascia longica Pringsheim* 的细胞培养物能够产生 2 种烯酮还原酶,可以还原芹酮的 C=C 双键。该反应具有部位特异性。

2.1.8 硝基还原反应:北洋金花 *Datura innoxia* Mill.、长春花以及茶藨属 *Myriophyllum* L. 植物细胞培养物都能够将 2,4,6-trinitrotoluene 经过硝基还原反应生成 2,4,6-aminodinitrotoluene。

2.2 利用固定化细胞培养进行生物转化:细胞培养产生次生代谢产物的方法的改进通常与植物细胞的器官化和分化有关,而器官化和分化的理论则是固定化技术应用的基础。固定化技术是一种将具有催化活性的酶或细胞固定在特定支持物上的技术,已被应用于前体的单步和多步生物转化生成目的产物以及生物合成次生代谢产物。有报道^[11]称利用嗜热固定化细胞系统可将糊精-麦芽糖复合剂转化为葡萄糖,转化率达 98%。

固定化植物细胞培养生物转化外源底物具有下列优势:①细胞抗剪切能力增强;②细胞可以长期重复使用;③可能产生较多的生物材料,从而转化更多底物;④细胞较易恢复;⑤转化产品处理更容易。

固定酶系统具一定的局限性,被分离的酶在极限 pH 值、加热和加入特定有机溶剂时很容易引起变性,在分离酶的过程中酶的活性会有损失,常常应用于单步反应中。而固定化植物细胞培养与固定酶系统相比,作为生物催化剂更具有其独特的优势:①它可实行多步酶反应;②选择高效生物合成细胞,其催化活性也可增加;③不需提供辅因子,因为细胞本身可合成;④固定化细胞比固定化酶更容易操作。因此,固定化细胞作为生物催化剂就显得更为重要。全细胞固定化培养还可创造一种类似全植物的有机组

织的微环境,可导致细胞分化并且产生较多的次生代谢产物。

常用的固定植物细胞的方法就是通过离子交换、沉淀、聚合,在预先固定好的结构上进行凝胶包埋。植物细胞可直接通过吸附固定,而酶可以利用氢键、偶极-偶极反应和疏水反应等吸附在支持物上,当酶的最适 pH 值与其等电点不接近时可以通过离子交换来固定,另外还可以利用共价结合。常用的支持物有聚丙烯和硅藻土。聚丙烯酰胺是酶固定化中比较常用的基质。除了凝胶包埋以外,还可以通过微囊技术来固定植物细胞。

酶和细胞所进行的生物转化也可以在膜反应器中进行。膜不但能够保留生物催化剂同时也允许基质、营养物质以及产物自由出入。与凝胶法相比,其流体动力学、流动分布更易控制,而且也更容易生产。此外,膜反应器还能更容易的维持反应器的无菌状态。

2.3 基因工程方法在生物转化中的应用:人们可以通过细胞株的选择、诱导、细胞通透性、射线、pH 值和渗透打击等使细胞培养物的生物转化能力达到最大。但最好的方法还是将编码催化生物合成反应的关键酶基因转入到真菌或细菌细胞中去增殖,然后再把这个克隆的基因转入到植物当中,并在其中表达。植物转基因技术不但能够有效地产生和改造现有的生物转化过程,而且对于研究基因功能和生理性调节及其发展过程都是一个强有力的工具和手段。如 Hashimoto 等报告了天仙子胺 6- β 羟化酶在大肠杆菌中的表达。重组大肠杆菌能够将天仙子胺转化为东莨菪碱。然后,将该基因转入颠茄 *Atropa belladonna* L. 中并且进行表达。后来 Hashimoto 等又报道了转基因的毛状根,在这种毛状根中天仙子胺向东莨菪碱的生物转化效率大大增加。

章焰生等^[12]用 RACE 方法从青蒿 *Artemisia annua* L. 高产株系 001 中克隆了一个过氧化物酶的基因。将此基因在大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 细胞中进行原核表达得到重组蛋白(APOD1),表达的蛋白分别以抗坏血酸、愈创木酚为底物进行过氧化反应,结果显示:APOD1 催化愈创木酚的活力是抗坏血酸的 1.8 倍左右,进一步证明了克隆的 APOD1 类属于植物经典过氧化物酶(第 3 大类过氧化物酶)。加入 APOD1 至青蒿细胞提取液有利于青蒿酸向青蒿素的生物转化。

2.4 利用微生物进行生物转化:高等植物细胞增殖速度较慢,而微生物繁殖速度极快且初级代谢迅速,

体内酶系相对简单。在极端环境下生存的微生物常能提供一些在极端条件下发挥作用的酶,微生物转化与哺乳动物的分解代谢机制相类似,故可作为预测药物代谢与毒理学方面的体外模型。王园园等^[13]研究了灰色链霉菌对芦丁的生物转化及其产物对超氧阴离子的清除能力变化,其中有 4 个代谢产物的抗氧化活性比底物芦丁强。转化过程涉及到黄酮苷类的去羟基化反应为首次发现,证实了微生物转化是增加天然化合物多样性的有效方法。

2.5 利用植物酶进行生物转化:虽然酶的制备技术看起来更适合于商业药物生产,但与细胞系统比起来,其应用与否主要取决于在分离酶的过程中活性损失与其生物转化高效率的优越性之间能否达到和谐统一。酶的羟基化和糖基化的部位选择性为改进后的药物的生产提供了机会。下面列举了一些从植物中分离出来的以自由或固定状态存在的酶,它们可催化一些重要反应。

2.5.1 木瓜蛋白酶:在橡胶树叶和番木瓜 *Carica papaya* L. 的绿色果实中都含有高浓度的硫醇蛋白酶——木瓜蛋白酶(papain)。木瓜蛋白酶是一种蛋白水解酶,可以水解肽键,在某些情况也可水解酯键。它可以催化正负两个方向的反应,而反应方向可能与水的浓度有关。木瓜蛋白酶可用于部位选择性水解反应,如该酶可部位特异性水解脱氢谷氨酸二酯 5 位上的酯键,而 α -胰凝乳蛋白酶只水解 1 位酯键。木瓜蛋白酶还具有特异性水解苯丙氨酸、亮氨酸的能力。

2.5.2 氧腈酶(oxynitrilases):是一类立体选择性酶,只作用于对映体中的一个。它们催化腈化氢加到醛上合成手性腈醇。氧腈酶是通用的合成 α -羟基酸和醛、乙醇胺、氨基醇、拟除虫菊酯杀虫剂、咪唑等的前体。根据其其对映选择性可分为 *R* 型和 *S* 型氧腈酶。

2.5.3 环化酶(cyclases):具有广泛的底物选择性,可用于环二烯及其环氧化物的环化。人们在菊苣中发现一个环化酶,该酶能够选择性环化大根香叶烷衍生物 germanone 的 4,5-环氧化物生成 neoprocureumenol。环化反应的第一步就是由酶介导的环氧化基团的加氢作用,然后闭合成环。

2.5.4 酚氧化酶(phenoloxydases):能够部位特异性催化单酚羟基化反应生成儿茶酚。Pras 等^[14]研究发现在刺毛黧豆 *Mucuna pruriens* (L.) DC. 的细胞培养物中由酚氧化酶催化可以生成一个非常重要的药用化合物:7,8-二羟基-*N*-二-*n*-丙基-2-氨基-4-氢化萘(7,8-dihydroxy-*N*-di-*n*-propyl-2-aminote-

tralin)。

2.5.5 卤化过氧化酶(haloperoxidases):以过氧化氢和卤化物离子为底物可催化许多有机化合物的卤化反应。这种酶广泛存在于哺乳动物、鸟、植物、藻类、真菌和细菌中,参与许多天然卤化产物的生物合成。在高等植物中它们通常催化单电子氧化反应生成脱氢产物和多聚体。人们已经阐明了由氯过氧化酶催化的茚(indene)的环氧化反应的立体化学^[15]。在水溶液当中,环氧化产物不稳定,形成顺-反二醇。在缺水的情况下大约有 30% 生成 1*R*,2*S* 对映异构体。

2.5.6 脂氧酶(lipoxygenases):是一不闭合的含电子酶,催化双氧化物结合成稳定的不饱和底物^[16]。这类酶立体选择性和部位选择性都很强。

2.5.7 细胞色素 P_{450} 单氧化酶:依赖细胞色素 P_{450} 的氧化反应在植物萜类的生物合成中起着非常重要的作用。由于其广泛的底物特异性,使得细胞色素 P_{450} 单氧化酶(cytochrome P_{450} monooxygenase)在催化体外生物转化中具有很大的潜力^[17]。洋地黄毒苷 12 β -羟化酶是存在于微粒体内的一种依赖细胞色素 P_{450} 的单氧化酶,人们将其从植物细胞培养物中分离出来后,用于催化 β -甲基洋地黄毒苷生成 β -甲基地高辛。

2.5.8 其他酶类:通过豌豆中的 α -氧化酶对长链羧酸酯的 α -羟基化来合成其光学纯的 2-羟酸已经达到半制备水平。由该酶所催化的饱和、不饱和及含有杂原子(如氧、硫)的羧酸酯的底物选择性可以看出,此生物转化过程具有高度的立体选择性。

3 展望

利用植物细胞、器官和酶在体外进行生物合成和生物转化的研究起步较晚,但其意义重大。特别是由于次生代谢途径具有多学科性特征,包括中间代谢产物的鉴定、推测可能的反应历程、有关酶的分离及特性以及这些酶在组织和亚细胞中的定位等,故利用生物合成与生物转化技术以及代谢途径工程的分子水平研究可以更好的理解基因和酶的属性,可在不同层次上加速体外生物转化在生产和新药研制开发中的应用。

植物细胞培养具有无法估量的生物化学能力,可以合成和转化不同有机化合物。生物合成与生物转化反应的类型和立体化学与底物功能基因以及功能基团周围的结构片段有关。因此,由植物细胞培养所进行的生物合成与生物转化对于药用化合物分子的生物合成和结构修饰用途广泛。一些基本信息,如外源化合物在生物合成与生物转化过程中的反应类

型、立体特异性及部位特异性对于中药及天然药物生物技术的发展是非常必要的。

此外,随着我国加入 WTO 及对外开发步伐的进一步加快,中药标准化、现代化、国际化已成为广大药学科工作者面临的艰巨任务。利用天然药物活性成分的生物合成与生物转化技术,研究和发现新的生物合成途径,寻找活性更强的化学成分,并进而创制具有我国自主知识产权的中药新药,必将为中药现代化的实现发挥重要作用。

References:

- [1] Xu R S. *Natural Product Chemistry* (天然产物化学) [M]. Beijing: Science Press, 2004.
- [2] Zhang X S, Zhang R T, Guo Y H, *et al.* Comparison of indole alkaloid among different callus of *Cantharanthus roseus* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(12): 938-940.
- [3] Wang M, Li Q R, Flore S D, *et al.* Expression of strictosidine synthase in selected subcellular compartments of tobacco plant [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2002, 44(5): 579-582.
- [4] Yang T, Zeng Y. Plant terpenoid synthases: molecular biology and genetic engineering [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2005, 27(1): 1-10.
- [5] Zhao C F, Yu L J, Liu Z, *et al.* Metabolic profiling analysis of taxanes in *Taxus chinensis* cell cultures elicited by methyl jasmonate [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2005, 27(5): 557-564.
- [6] Liu J, Ding J Y, Zhou Q Y, *et al.* Studies on influence of fungal elicitor on hairy root of *Panax ginseng* biosynthesis ginseng saponin and biomass [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(4): 302-304.
- [7] Fang C B, Wan X C, Jiang C J. Progress in studies of flavanoid biosynthesis [J]. *J Anhui Agric Univ* (安徽农业大学学报), 2005, 32(4): 498-504.
- [8] Zhou L G, Ruan D C, He Z D, *et al.* Biotransformation of artemisinin by hairy roots of *Cyanotis arachnoidea* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1998, 20(2): 229-232.
- [9] Yang L, Dai J G. Biotransformation of 6 β -santonin by *Phytolacca acinosa* cell suspension cultures [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2005, 40(9): 843-847.
- [10] Liu Y, Cheng K D, Zhu P, *et al.* Biotransformation of 3 β -hydroxyandrost-5-en-17-one by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2004, 46(8): 935-939.
- [11] Schiraldi C, Martino A, Costabile T, *et al.* Glucose production from maltodextrins employing a thermophilic immobilized cell biocatalyst in a packed-bed reactor [J]. *Enzym Microbial Technol*, 2004, 34(5): 415-421.
- [12] Zhang Y S, Liu B Y, Li Z Q, *et al.* Molecular cloning of a classical plant peroxidase from *Artemisia annua* and its effect on the biosynthesis of artemisinin *in vitro* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2004, 46(11): 1338-1346.
- [13] Wang Y Y, Yu B Y, Li X, *et al.* Biotransformation of rutin by *Streptomyces griseus* and antioxidation of metabolites [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2006, 4(1): 66-69.
- [14] Pras N, Batterman S, Dijkstra D, *et al.* Continuous production of the pharmaceutical 7, 8-dihydroxy *N*-di-*N*-propyl 2-aminotertralin using a phenoloxidase from cell cultures of *Mucuna pruriens* [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 1990, 23: 209-215.
- [15] Manoj K M, Lakner F J, Hager L P. Epoxidation of indene by chloroperoxidase [J]. *J Mol Cal B Enzym*, 2000, 9: 107-111.
- [16] Deoliveira D A, Povesan N D. Identification of the 3 genotypic classes for soyabean lipoxygenase-1 and lipoxygenase-3 based on enzymatic activity [J]. *Biotechnol Tech*, 2000, 73: 279-282.
- [17] Bolwell G P, Bozak K, Zimmerlin A. Plant cytochrome P₄₅₀ [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(6): 1491-1506.

敬告读者

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括:1974-1975年、1976年、1979年、1985-1994年(80元/年)、1995-1997年(110元/年)、1998年(120元/年)、1999年(135元/年)、2000年(180元/年)、2001-2003年(200元/年)、2004年(220元/年)。1996年增刊(50元)、1997年增刊(45元)、1998年增刊(55元)、1999年增刊(70元)、2000年增刊(70元)、2001年增刊(70元)、2002年增刊(65元)、2003年增刊(65元)、2004年增刊(65元)、2005年增刊(65元)。欢迎订购。订购者请直接与《中草药》杂志编辑部联系。

电话:(022) 27474913 23006821

传真:(022) 23006821

E-mail: zcyzzbjb@tjipr.com