

血竭诱导及形成机制的研究进展

赵婷¹, 杨玲玲², 刘姮¹, 蒋德伟¹, 王云², 王兴红^{2*}

(1. 云南大学生命科学学院, 云南昆明 650091; 2. 云南大学云南省微生物研究所, 云南昆明 650091)

摘要: 血竭是一种名贵中药, 是由龙血树分泌的抵抗微生物侵染所产生的一种植物抗毒素。近年来, 由于临床需求量的增加和资源的减少, 龙血树的人工种植产业迅速发展, 迫切需要规模化的诱导产脂技术及对血竭形成的机制进行深入的研究。血竭中的主要有效成分黄酮类化合物是通过苯丙烷途径形成的, 其中的质量控制成分龙血素 b 的形成还与 P450 氧化酶和甲基转移酶密切相关。镰孢霉的菌丝体是有效的诱导子; 在龙血树组织培养中, 光和 6-BA 也有诱导效果。血竭的形成部位是木质部中的薄壁细胞, 木质部还含有抗菌前体物质。

关键词: 龙血竭; 诱导; 形成机制

中图分类号: R282.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2010)04-附5-04

Advances in studies on induction and formation mechanism of Dragon's blood resin

ZHAO Ting¹, YANG Ling-ling², LIU Heng¹, JIANG De-wei¹, WANG Yun², WANG Xing-hong²

(1. School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China; 2. Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Key words: Dragon's blood resin; induction; formation mechanism

血竭是一种由龙血树分泌的红色树脂, 有活血化瘀、止血、补血的显著功效, 被称为“活血圣药”, 在我国和世界多个国家都有悠久的历史^[1]。国产血竭就是从剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen、海南龙血树 *D. cambodiana* Pierre ex Gagnep. 树干中分泌的红色树脂中提取的, 最先由蔡希陶教授发现并开发作为我国传统进口血竭的替代品, 称之为“龙血竭”^[2]。由于龙血树生长速度极其缓慢, 而血竭的临床需求量却越来越大, 导致野生龙血树被过度采伐, 已使其资源枯竭, 血竭的原料供应和现实的市场需求之间存在着巨大的矛盾。人工种植龙血树并诱导产脂是龙血竭产业可持续发展的最根本解决办法, 已有多家企业开展了龙血树的规模化人工种植。在自然状态下, 龙血树形成血竭的产量往往不稳定或很少, 很多情况下产品质量达不到国家药材标准, 主要是血竭的质控成分龙血素 b 的量过低, 很难满足实际生产对原料的需求。由于现阶段人们对血竭的形成机制了解得还不够深入, 仅仅是停留在一些表面现象上, 无法指导血竭产业在规模化种植后诱导技术发展的需求。只有对血竭的形成机制进行更深入、更明确的研究, 才能开发出高效的诱导产脂技术, 进而提高人工种植龙血树的血竭产量和质量。否则, 龙血树的人工种植就不可能产生经济价值, 血竭产业可能就此严重萎缩。

1 镰孢霉与血竭

1.1 镰孢霉诱导活体龙血树产生血竭: 人们很早就认识到血竭是从龙血树 *D. draco* L. 树干上的伤口分泌的^[3], 且发

现在血竭的形成部位常常有微生物存在, 因此怀疑血竭的形成与微生物有关^[2]。

江东福等^[4]从龙血树茎杆上分离到的菌株中, 镰孢霉属菌株占总分离数的 52%。将从龙血树上获得的各种不同的微生物菌株返接于龙血树枝条内, 发现禾谷镰孢霉 *Fusarium gramineum* Schw. 具有诱导形成血竭的良好效果。另有多位研究者得到了类似结果, 只是诱导产脂的镰孢霉种类有所不同。王兴红等^[5]发现了 2 株串珠镰孢霉 *F. moniliforme* Sheld 具有良好的诱导产脂效果; 宋启示等^[6]发现黄色镰孢霉 *F. culmorum* Martiella 也能诱导血竭形成。以上研究结果说明镰孢霉对血竭的形成有良好的诱导效果, 且尚未发现其他的微生物类群能诱导血竭形成。考虑到镰孢霉也是龙血树上类群最丰富的真菌, 可以认为镰孢霉和龙血树有密切关系, 也和血竭形成有密切关系。至于镰孢霉对诱导血竭的特异性和专一性, 还有待进一步的研究。

1.2 死态和培养状态下的血竭形成: 江东福等^[7,8]发现, 自然状态下不仅在活的龙血树上会形成血竭, 在死亡的龙血树上有时也有一定量的血竭形成。将串联镰孢霉 9568D 菌株接于热处理后的龙血树上, 并埋于沙土中, 保湿培养 10~15 d 即可观察到接种部位颜色变红; 继续培养 4~5 个月, 在红色区域有大小不等的血脂颗粒出现, 而对照组却无此现象。同时发现了此红色血脂与天然血竭的乙醇提取物的抗菌活性和光谱特征十分相似。

王兴红等^[1]发现单纯的龙血树木质材料中并不含有黄

收稿日期: 2009-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (J073652); 云南大学生命科学实验教学示范中心创新实验项目

*通讯作者 王兴红 E-mail: wxihong@sina.com

酮类化合物;真菌和细菌分别接种培养后的龙血树木质材料也都没有黄酮类化合物的产生。在试管中,灭菌后的龙血树白木质上加入细菌发酵液,并同时接入真菌,能将龙血树白木质中非黄酮类的前体物质转化成为黄酮类化合物,形成黄酮的前体物质存在于龙血树木质甲醇提取物中。其他植物的木质水浸液培养相同的镰孢霉则不出现红色物质。

2 血竭的形成与龙血树的木质部密切相关

龙血树木质中的薄壁细胞是血竭的分泌组织^[9]。血竭中的黄酮类化合物的代谢途径和木质素的代谢途径一样起源于苯丙烷途径。在高等植物体中,木质部组织中的黄酮多为游离的苷元,血竭中的黄酮也多为游离苷元。木质素的作用主要是增加植物的硬度、机械支撑性能、水不可透性、抗病原微生物侵染的能力。龙血树木质部形成血竭的过程与植物通常的木质化反应的生理效应有一定的相似性。第一,血竭的形成增加了龙血树细胞抗真菌穿透的阻力;第二,干燥的龙血竭可以在一定程度上增加产脂木质的硬度和机械支撑性能;第三,龙血竭的水不溶性不仅能限制真菌酶和毒素向寄主扩散,还能限制水和营养物质从寄主向真菌扩散,实际上起到“饿死”病原菌的作用;第四,龙血竭的相对分子质量低的酚类前体物质,以及多聚作用时产生的游离基可以钝化真菌的膜、酶、毒素。杨本鹏等^[10]发现已经生长有茎杆的龙血树组培小植株产生的红色较深,说明血竭的形成可能与组培苗的木栓化程度有关,且木栓化程度越高,越容易诱导血竭的形成。

3 血竭形成的途径

血竭是龙血树在受到伤害或微生物入侵后形成的防御产物。在没有产生血竭的新鲜龙血树木质中,血竭中的酚类成分几乎不存在。也就是说,血竭是龙血树产生的一种植物抗毒素。植物抗毒素一般只局限在植物受侵染的细胞周围积累,并不运输到整个植物体的其他部位,这一点也和血竭的特性相同。

虽然直接研究血竭形成的生源途径的报道尚未见到,但可根据血竭中的成分推断血竭形成的可能途径。血竭的成分虽然多种多样,但主要是二氢查耳酮及其多聚体,还有一些其他的黄酮类、黄酮、芪类化合物,以及少量的甾醇。药理实验研究表明,血竭的活性成分也主要是其中的黄酮类化合物^[11]。目前,植物体中黄酮类化合物的生物合成途径已有大量文献报道,即苯丙烷途径。苯丙烷途径是从莽草酸途径衍生的植物特有的次生代谢途径,是植物3大次生代谢途径之一。血竭中的绝大多数成分都符合这一合成规律。

迄今,有关黄酮类化合物生物合成的相关酶系都已得到证实并进行了系统的研究,从而使得黄酮类化合物生物合成途径已成为植物体中研究得最为深入的代谢途径之一^[12]。来自莽草酸途径的莽草酸通过分枝酸、预苯酸经转氨作用形成苯丙氨酸,从而进入苯丙烷类代谢途径:苯丙氨酸脱氨后形成肉桂酸,然后羟基化形成对-香豆酸、咖啡酸等酚酸类;酚酸类再与3分子的乙酰辅酶A缩合,形成查耳酮和二苯乙烯类化合物;查耳酮进一步环化成为黄酮类化合物。苯丙

氨酸解氨酶(PAL, EC4.3.1.5)、肉桂酸4-羟化酶(CA4H, EC1.14.13.11)和4-香豆酸-CoA联结酶(EC6.2.1.12)是此途径的3个关键酶。此外,参与此途径的还有甲基转移酶(OMT)和酚酶。与黄酮类化合物代谢相关的酶是一种膜相关的多酶体系。所以,血竭形成的可能途径是以苯丙氨酸或酪氨酸为起点,经过多次酶促反应,分别合成水杨酸、查耳酮、多聚查耳酮、黄酮类、高异黄酮类、色原酮类、黄酮类、简单酚类、芪类等血竭成分(可能的合成途径见图1)^[13,14]。

龙血竭的国家标准是以龙血素b为质量控制指标,一些药理研究也证明龙血素a和b是血竭的重要药理活性成分^[15]。与龙血素a的形成相比,龙血素b在药材中的量普遍偏低。所以,对龙血素b形成途径的研究就具有特别重要的意义。和龙血素a相比,龙血素b在2位多了一个甲氧基,这个甲氧基的形成应该是2,4,4-三羟基二氢查耳酮被羟基化,然后再甲基化。所以,与龙血素b密切相关的酶主要有2类:2,4,4-三羟基二氢查耳酮P450氧化酶和甲基转移酶。

细胞色素P450氧化酶是一类以还原态与CO结合后在波长450nm处有吸收峰的含血红素铁硫蛋白的多功能氧化酶,其催化作用的特点是在底物分子中加入一个氧原子。植物细胞色素P450氧化酶具有广泛的催化合成,可以催化许多具有防御功能的次生代谢产物合成。在苯丙烷衍生物次生物质的生物合成中,已报道的由P450酶催化的反应超过16个。如在苯丙烷类化合物的代谢途径中,反式-肉桂酸转化为对-香豆酸的作用是由肉桂酸4-羟化酶(cinnamate-4-hydroxylase, C4H)催化的,这是植物中第一个被鉴定的P450酶。黄酮类化合物的羟基化大多数都是由P450酶催化的^[16-18]。

黄酮类化合物的甲基化可以减少酚羟基的化学活性,增加其抗微生物的活性^[19]。血竭中的许多成分都是甲基化产物,这些甲基化产物是由甲基转移酶(OMTs, EC2.1.1)催化形成的,甲基转移酶以S-腺苷-L-甲硫氨酸为通用的甲基供体甲基化羟基基团^[18]。

4 血竭形成的人工调控

管康林等^[20]最先进行了植物激素诱导龙血竭形成的实验。发现10%乙烯利、0.5%~1%的2,4-D、2%的硫酸铜均具有一定的诱导产脂效果。王兴红等^[5]最先利用镰孢霉诱导血竭的形成,后来又发现接种串珠镰孢霉可以使血竭量增加3~4倍。目前为止,很多报道都认为镰孢霉是诱导血竭形成最有效的菌株。镰孢霉是一类以产生赤霉素而著名的植物病原菌,但笔者对镰孢霉进行分析,未发现有赤霉素的产生,只发现一株菌株有少量的生长素产生。这说明赤霉素和生长素不是镰孢霉诱导血竭形成的因子。郑庆安^[13]通过对龙血竭的分析,也未发现龙血竭中含有茉莉酸甲酯和水杨酸甲酯,这说明血竭的形成与常见的茉莉酸甲酯和水杨酸甲酯诱导抗性的代谢途径不同。镰孢霉的菌丝体对血竭的形成有明显的诱导效果,且灭菌不影响菌丝体的诱导活性。在其他植物的诱导抗性研究报道中,发现菌丝体中的有效诱导

子为多糖类物质,镰孢霉菌丝体中的多糖可能是诱导血竭形成的诱导子。

杨本鹏等^[10]利用海南龙血树无菌组培苗进行研究,仅发现在含有 6-BA 的培养基上产生鲜艳的红色物质,且颜色深浅与 6-BA 的浓度无关,说明 6-BA 能诱导龙血树无菌组培苗产生血竭,且诱导的效果与供试范围内的剂量大小无关;血竭的形成可能与组培苗的木栓化程度有关,木栓化程度越高,越容易诱导血竭的形成;同时在组培苗的基部造成伤口也是血竭形成所必须的。这一现象与在树上的木质部受伤才能形成血竭的现象是一致的;实验还发现诱导的效果与光照强度呈正相关。

血竭中的成分主要是苯丙烷类代谢途径形成的化合物。苯丙烷类代谢酶系是诱导酶,几乎所有的真菌都能刺激苯丙烷途径。光、机械伤害、外源植物激素、悬浮培养细胞稀释、病原菌感染和毒素处理都能诱导苯丙氨酸解氨酶活性增加。加入前体化合物,可以消除关键酶的阻碍或阻断内源性中间体的分隔或有效贮存,大大提高次生代谢产物和黄酮类化合物的产量。

通过植物次生代谢基因工程技术,转入某些关键酶的基因或其反义基因对植物次生代谢途径的遗传特性进行改造,也有望提高龙血树的血竭产量。

5 结语

对血竭形成机制的研究是认识龙血树的抗性反应本质和规律的基础,也是发展龙血树生产血竭的要求。血竭的形成是龙血树一种特殊的抗性生理反应,遵从一般的植物抗性反应规律,但又有其明显的特殊之处,有不同于其他植物的化合物组成,很多细节有待于人们进行更深入的了解。虽然诱导血竭产量的技术已有较大的进步,但如何提高血竭中的控制性成分龙血素 b 的量尚无明确的方法,还需要进一步深入的研究,这也是龙血竭产业发展很现实紧迫的需要。

参考文献:

- [1] 王兴红. 细菌、真菌共代谢转化龙血树木质形成黄酮类化合物 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(1): 11-15.
- [2] 蔡希陶, 许再富. 国产血竭植物资源的研究 [J]. 云南植物研究, 1979, 1(2): 1.
- [3] Gupta D, Bleakley B, Gupta R K. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 115: 361-380.
- [4] 江东福, 马萍, 王兴红, 等. 龙血树真菌群及其对血竭形成的影响 [J]. 云南植物研究, 1995, 17(1): 79-82.
- [5] 王兴红, 江东福, 马萍, 等. 真菌与龙血树血竭形成关系的初步研究 [A]. 中国青年科学技术论文精选 [C]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- [6] 宋启示. 一种龙血竭的人工培育方法 [P]. 中国: 200610010734, 2006-08-23.
- [7] 江东福, 马萍, 杨靖, 等. 9568D 镰孢霉作用于死态龙血树形成血脂的研究 [J]. 应用生态学报, 2003, 14(3): 568.
- [8] 杨靖, 江东福, 马萍. 特异性真菌作用于龙血树材质形成血竭的研究 [J]. 中草药, 2004, 35(5): 572-574.
- [9] 樊兰兰, 屠鹏飞, 何鉴星, 等. 中药龙血竭原植物剑叶龙血树的形态组织学研究及所含树脂的分布和成分检测 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(10): 1112-1117.
- [10] 杨本鹏, 张树珍, 蔡文伟, 等. 海南龙血树组织培养过程中血竭形成的诱导 [J]. 热带作物学报, 2009, 30(2): 181-185.
- [11] 马建建, 宋艳, 贾敏, 等. 血竭总黄酮对血小板聚集、血栓形成及心肌缺血的影响 [J]. 中草药, 2002, 33(11): 1008-1010.
- [12] 张华峰, 王瑛, 黄宏文. 黄酮类化合物生物合成途径的进化及其淫羊藿中的研究展望 [J]. 中草药, 2006, 37(11): 1745-1751.
- [13] 郑庆安. 龙血竭研究 [D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所博士论文, 2003.
- [14] 方从兵, 宛晓春, 吕俊. 黄酮类化合物生物合成的研究进展 [J]. 安徽农业大学学报, 2005, 32(4): 498-504.
- [15] 陈旭, 雍克岚, 吕敬慈, 等. 龙血竭小鼠灌胃给药后血中移行成分的分析 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 352-355.
- [16] 贺丽虹, 赵淑娟, 胡之璧. 植物细胞色素 P450 基因与功能研究进展 [J]. 药物生物技术, 2008, 15(2): 142-147.
- [17] 钟巍然, 柴友荣, 张凯, 等. 苯丙烷代谢途径中细胞色素 P450 的研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(13): 5285-5289.
- [18] Ferrer J L, Austin M B, Stewart J C *et al.* Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2008, 46: 356-370.
- [19] 田铃, 嵇保中, 刘曙雯, 等. 甲基转移酶的功能与分类 [J]. 生命的化学, 2007, 27(5): 425-427.
- [20] 管康林, 肖耀文. 国产龙血树的割脂初步研究 [J]. 热带植物研究, 1974, 6: 11-24.

葛根芩连汤的现代研究进展

陈丽红^{1,2}, 唐于平¹, 王强³

(1. 南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046; 2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046; 3. 中国药科大学 中药分析教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 葛根芩连汤为医圣张仲景的名方之一, 由葛根、黄芩、黄连与炙甘草 4 味中药组成。此方广泛用于治疗菌痢、肠伤寒等各科疾患, 疗效显著。近年来对其药效物质及其分析方法、药理作用和配伍机制等进行了广泛的实验研究, 就近 10 年来葛根芩连汤的研究进展进行综述, 为探索方药现代研究思路与方法提供实践经验与积累。

关键词: 葛根芩连汤; 质量控制; 配伍规律

中图分类号: R284; R283.2; R285

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)04-附 8-05

收稿日期: 2009-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30901995)

作者简介: 陈丽红 (1975—), 女, 浙江台州人, 博士, 主要从事中药及复方效应物质基础方面的研究。

Tel: (025) 85811133 E-mail: ch_helen@163.com