

- SRAP, SNP and multiplexed SCAR molecular markers for the major seed coat color gene in *Brassica rapa* L. [J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 1101-1107.
- [9] 陈晓梅, 郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 70-75
- [10] 郑晓珂, 曹新伟, 冯卫生, 等. 金钗石斛的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14(7): 836-839
- [11] 杨水云, 李续娥, 吴明宇, 等. 正交实验法在 PCR 反应条件优化中的应用 [J]. 生物数学学报, 2005, 20(2): 202-206
- [12] 樊洪泓, 李廷春, 邱 婧, 等. 石斛属植物 SRAP 反应体系的建立与优化 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(6): 153-156
- [13] 王燕燕, 徐 红, 魏丹红, 等. 金钗石斛遗传多样性研究的随机扩增多态性 DNA-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2827-2830

黄花蒿悬浮培养细胞对二氢青蒿酸的生物转化研究

唐 煜, 朱建华, 于荣敏^{*}
(暨南大学药学院, 广东 广州 510632)

摘要:目的 采用黄花蒿悬浮培养细胞研究二氢青蒿酸(I)的生物转化。方法 向预培养 14 d 的黄花蒿细胞悬浮培养体系中加入底物二氢青蒿酸, 培养 2 d 后终止转化。通过 TLC 和 HPLC 检测转化产物, 利用硅胶、Sephadex LH-20 以及 ODS 柱色谱分离纯化转化产物, 并根据理化数据和波谱技术鉴定转化产物的化学结构, 最后利用 HPLC 考察共培养时间对转化率的影响。结果 二氢青蒿酸在黄花蒿培养体系中成功地进行了转化并分离得到两个转化产物: 3- α -羟基二氢青蒿酸(IIa)和 3- β -羟基二氢青蒿酸(IIb)。两个转化产物的最佳共培养时间均为 1 d, 总的摩尔转化率分别为 2.6% (IIa) 和 15.7% (IIb)。结论 本研究首次利用黄花蒿培养细胞生物转化二氢青蒿酸, 且得到一对区域特异性的羟基化转化产物。

关键词: 黄花蒿; 悬浮培养细胞; 二氢青蒿酸; 生物转化

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)08-1358-04

Biotransformation of dihydroartemisinic acid by suspension culture cell of *Artemisia annua*

TANG Yu, ZHU Jian-hua, YU Rong-min
(College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Objective To investigate the biotransformation of dihydroartemisinic acid (I) by cultured cells of *Artemisia annua*. **Methods** Dihydroartemisinic acid was added to the suspension cells of *A. annua* which had been pre-cultured for 14 d and co-cultured for another 2 d. The biotransformed products were detected with TLC and HPLC, and isolated by various chromatographic methods. **Results** The chemical structures of biotransformed products were elucidated on the basis of spectroscopic data. 3- α -Hydroxy-dihydroartemisinic acid (IIa) and 3- β -hydroxy-dihydroartemisinic acid (IIb) were obtained after 2 d administration of dihydroartemisinic acid to the suspension cells of *A. annua*. IIa and IIb yields could reach a maximum mole ratio of 2.6% and 15.7% after 1 d incubation, respectively. **Conclusion** It is the first time for the biotransformation of dihydroartemisinic acid to epimeric 3-hydroxyartemisinic acid by using suspension culture cell of *A. annua*. The results indicate that cells of *A. annua* have the ability to hydroxylate dihydroartemisinic acid region selectively.

Key words: *Artemisia annua* L.; suspension culture cell; dihydroartemisinic acid; biotransformation

生物转化是利用生物活性的酶体系对外源性底物进行结构修饰的一种生物学方法^[1-2]。它作为化学修饰的重要补充, 在活性分子或药物分子结构修饰方面, 具有独特的优势, 已经得到了广泛的应用^[3-6]。天然产物的结构通常比较复杂, 分子中多含有手性中心, 采用化学方法对其进行结构修饰常会

遇到很多困难。而利用生物转化反应, 由于其具有区域专一性和立体选择等特点, 则有可能获得具有新颖取代方式的衍生物^[7]。

黄花蒿 *Artemisia annua* L. 是菊科艾属植物, 含有多钟药用活性成分, 如青蒿素等是传统中药治疗疟疾的主要有效药物^[8]。然而由于青蒿素在黄花

* 收稿日期: 2009-12-18

作者简介: 唐 煜 (1984—), 男, 湖南永州人, 硕士, 研究方向为活性成分的生物转化与生物合成。

* 通讯作者 于荣敏 Tel: (020) 85220386 E-mail: tyrm@jnu.edu.cn

蒿植物中的量很低^[9]以及化学合成非常复杂^[10]等不利因素而严重制约了青蒿素以及青蒿素类衍生物的开发及其应用。二氢青蒿酸是青蒿素生物合成的前体^[11],在植物体内的量比青蒿素高^[12]。因此,利用二氢青蒿酸作为底物,采用生物转化的方法来得到青蒿素类衍生物具有重大创新意义,目前还未见相关报道。Kawamoto 等^[7]利用黄花蒿悬浮培养细胞对二氢青蒿酸的 11, 13 脱氢同系物青蒿酸进行了生物转化研究,分离并鉴定了 3 个糖基化产物。本实验利用黄花蒿悬浮培养细胞对二氢青蒿酸进行生物转化研究,旨在为尚未完全阐明的青蒿素类衍生物的生物合成途径研究提供新方法和新思路;同时,亦期望对化学合成青蒿素类衍生物研究起到一定的指导作用。

1 材料与试剂

1.1 仪器与试剂:ESI-MS 用 Bruker esquire 2000 mass spectrometer 测定;NMR 用 Bruker AV2400 (400 MHz for ¹H, 100 MHz for ¹³C-NMR spectrometer 测定 (TMS 为内标);柱色谱硅胶采用青岛化工厂硅胶;TLC 用青岛化工厂生产的硅胶 H 预制薄板和 Merck HPLC 8F254 预制薄板;ODS 购自日本 YMC 公司;Sephadex LH-20 购自 Pharmacia Co.。HPLC 分析采用安捷伦 1200 系统;色谱柱为安捷伦 Hypersil ODS 柱。

1.2 底物:二氢青蒿酸,由本研究组从黄花蒿叶中分离得到,经 HPLC 验证其质量分数>95%。使用前用无水乙醇配成 50 mg/mL 的溶液。

1.3 培养体系:以黄花蒿的嫩茎和嫩叶为外植体,诱导愈伤组织^[14]。将经过多次继代培养的愈伤组织接种于装有 200 mL 含 1.0 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤 (6-BA) 和 0.5 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 及 3% 蔗糖的 MS 培养基的 500 mL 三角瓶中,25 ℃ 振荡暗培养,摇床转速为 110 r/min。每 25 d 继代 1 次,每瓶接种黄花蒿细胞鲜质量 10 g。

2 实验方法

2.1 生物转化方法:向 3 瓶预培养 14 d 的黄花蒿悬浮培养细胞中分别加入 50 mg/mL 的底物 (I) 乙醇溶液 0.1 mL,迅速摇匀。同样条件下继续培养 2 d。另取 3 瓶培养物,每瓶加入相同体积的无水乙醇 (不含底物) 作为空白对照。

2.2 转化产物的检测:培养结束后将培养液滤过,获得的培养基用等体积的醋酸乙酯萃取 4 次,合并醋酸乙酯萃取液减压浓缩至干,浸膏用少量甲醇溶解,待检;培养物则于 55 ℃ 条件下烘干至恒重,乳

钵研细,然后用 10 倍 (质量体积比) 的甲醇于室温下浸置 12 h,再反复超声提取 3 次,每次 30 min。合并甲醇提取液,减压蒸干后所得残渣用蒸馏水混悬。最后再用等体积的醋酸乙酯萃取 3 次,合并醋酸乙酯萃取液浓缩至干。同样,浸膏用少量甲醇溶解,待用。将底物标准品、培养基和培养物的提取物 (样品及对照),一起点于硅胶 G 板上,以石油醚-醋酸乙酯 (1:1) 展开,1% 香草醛-浓硫酸显色。

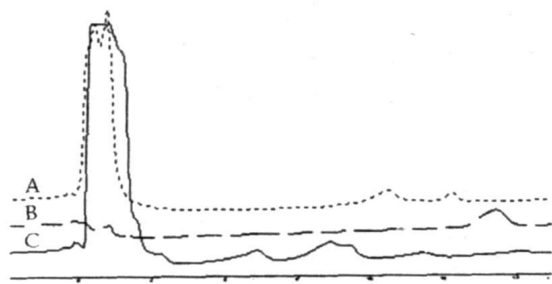
2.3 转化产物的分离纯化:向预培养 14 d 的黄花蒿细胞培养体系中加入底物 (I) 300 mg,继续培养 2 d 后对其培养物和培养基分别进行处理,获得的醋酸乙酯层萃取液浓缩至干,得浸膏。将浸膏用硅胶柱色谱分离,石油醚-醋酸乙酯梯度洗脱。初步分离得到的转化产物再反复上 Sephadex LH-20 凝胶柱和 ODS 反相柱,分别得到油状物 IIa 和针状结晶 IIb。

2.4 共培养时间对产物转化率的影响:严格控制接种量,向 18 瓶预培养了 14 d 的黄花蒿悬浮培养细胞培养瓶中每瓶分别加入 50 mg/mL 底物甲醇溶液 0.1 mL 进行共培养。分别在共培养 1、2、3、4、5、6 d 后取出 3 瓶终止转化。抽滤,分获培养物和培养基,处理方法同 2.2。得到的浸膏用甲醇定容至 5 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后用于 HPLC 检测分析。HPLC 检测条件:流动相为甲醇 (A)-水 (B);洗脱条件:0~5 min, 60%~70% A;5~10 min, 70%~80% A;10~15 min, 80%~90% A;体积流量 0.8 mL/min;柱温 30 ℃;检测波长 210 nm。

3 结果

3.1 转化产物的 HPLC 检测:比较对照组和底物组的 HPLC 色谱图 (图 1),在底物组的醋酸乙酯层中存在 2 个新色谱峰,结合 TLC 结果可知二氢青蒿酸在黄花蒿悬浮细胞中发生了生物转化反应。

3.2 转化产物的结构鉴定:转化产物 IIa 为无色油状物,ESI-MS m/z : 275 [M + Na]⁺ 峰,ESI-MS m/z : 251 [M - H]⁺ 峰,因此推断 IIa 的相对分子质量为 252,比底物 (I) 多了 16,推测可能为底物 (I) 的羟基化产物。IIa 的碳谱与 I 比较,其明显的区别为转化产物 IIa 的 C-15 信号峰向高场移动了 4.5 (δ23.7~19.2),且另一信号则显著向低场移动 (δ26.6~66.9)。IIa 的 δG-15 向高场移动可能是由于底物 IIa 的 G-3 位发生了羟基化而产生的 γ 效应所引起的。为了鉴定 IIa 羟基的构型,对其进行了 NOESY 测定。NOESY 谱显示,H-3 (δ4.07) 和 H-10 (δ1.41),H-3 和 Me-15 (δ1.75),H-3 和 H-2β



A-底物组醋酸乙酯层溶液 B-底物溶液

G-空白组醋酸乙酯层溶液

A-EtOAc extract of experimental cultures

B-dihydroartemisinic acid G-EtOAc extract of control cultures

图1 二氢青蒿酸(I)在黄蒿悬浮细胞中生物转化的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of dihydroartemisinic acid (I) biotransformed by cell suspension cultured of *A. annua*

(δ : 33), H-2 α (δ : 58) 相关, 且 H-3 和 H-2 β 相关的点比 H-3 和 H-2 α 相关的点大很多, 因此, IIa 被确定为 3- α -羟基二氢青蒿酸。化合物 IIa: ES-MS m/z 251 [$M - H$] $^+$, 275 [$M + Na$] $^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ : 0.93 (4H, d superimposed on m, $J = 6.0$ Hz), 1.14 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 1.75 (3H, s, 15-CH $_3$), 2.60 (1H, br s), 4.07 (1H, m), 5.29 (1H, s); ^{13}C -NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ 41.8 (G-1), 35.2 (G-2), 66.9 (G-3), 138.8 (G-4), 121.6 (G-5), 36.8 (G-6), 44.5 (G-7), 27.3 (G-8), 36.4 (G-9), 28.3 (G-10), 43.6 (G-11), 177.2 (G-12), 14.6 (G-13), 19.1 (G-14), 19.2 (G-15)。

转化产物 IIb 与转化产物 IIa 具有相同的相对分子质量, IIb 与 IIa 的氢谱、碳谱相比, 发现两者非常相似。IIb 与 IIa 碳谱最大的区别在于 C14 和 C15 的 δ 不同。IIa 的 G-14 和 G-15 的 δ 分别为 19.1 和 19.2, 而 IIb 的 G-14 和 G-15 的 δ 则分别为 20.6 和 21.2。IIb 的氢谱、碳谱数据与文献对照基本一致^[15], 故将 IIb 鉴定为 3- β -羟基二氢青蒿酸。化合物 IIb: 无色针晶; ES-MS m/z 251 [$M - H$] $^+$, 275 [$M + Na$] $^+$; 1H -NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ 0.92 (4H, d superimposed on m, $J = 6.4$ Hz), 1.13 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 1.78 (3H, s), 2.27 (1H, dd, $J = 14.2, 2.2$ Hz, H-2), 3.96 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-3a), 5.33 (1H, s); ^{13}C -NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ : 42.3 (G-1), 35.7 (G-2), 67.4 (G-3), 139.2 (G-4), 122.8 (G-5), 38.0 (G-6), 44.6

(G-7), 28.4 (G-8), 36.7 (G-9), 29.4 (G-10), 42.5 (G-11), 176.5 (G-12), 15.5 (G-13), 20.6 (G-14), 21.2 (G-15)。

3.3 转化产物的时效 (T-C) 曲线: 从图 2 可以看出, 转化产物 IIa 与 IIb 均在投入底物 (I) 1 d 后转化率达最高, 分别为 2.6% 及 15.7%。之后其量均随着时间的延长而降低。

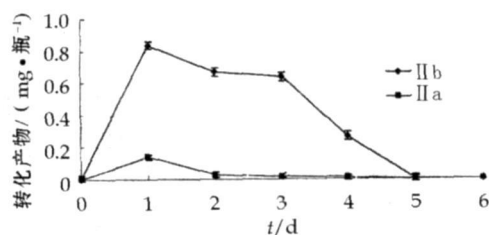


图2 共培养时间对转化产物在黄花蒿体系中量的影响

Fig. 2 Time-course experiments in biotransformation of dihydroartemisinic acid with cell suspension culture of *A. annua*

4 讨论

在底物分子结构中的不同位置, 区域性的引入氧化基团 (主要是羟基) 是植物体系生物转化的一个重要特点。本实验首次利用药用植物黄花蒿悬浮培养细胞作为生物转化体系对外源性底物二氢青蒿酸进行转化研究, 分离并鉴定了 2 个互为差向异构体的羟基化转化产物 (图 3), 提示我们二氢青蒿酸能诱发并激活黄花蒿细胞内的可进行 3 位羟基化的酶系统, 从而进一步发生酶催化反应。从转化产物的时效曲线 (图 2) 可以初步推断, 在投入底物二氢青蒿酸第 1 天时黄花蒿细胞体内的特异性酶活性表达最强, 此时 IIa 和 IIb 的转化率达到最高。

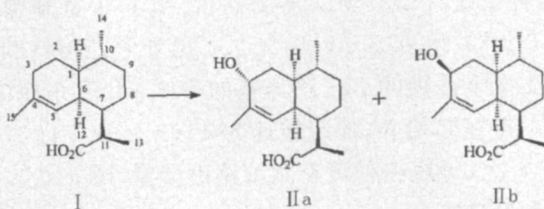


图3 黄花蒿悬浮培养细胞对二氢青蒿酸的生物转化

Fig. 3 Biotransformation of dihydroartemisinic acid by cell suspension culture of *A. annua*

此外, 从图 2 还可以看出: 2 个转化产物的量在第一天达到最高后迅速下降, 可以推测转化产物 IIa 和 IIb 在后期可能会继续发生转化反应, 生成新的转化产物。目前, 此实验工作还在进一步研究中。

另据报道^[13], 黄花蒿悬浮培养细胞能在青蒿酸 3 位及 9 位进行羟基化, 而本研究未检测到 9-羟基

二氢青蒿酸的生成。因此,我们初步推测,黄花蒿悬浮培养细胞对倍半萜类外源底物进行羟基化时可能具有底物选择性。

参考文献:

- [1] Loughlin W A. Biotransformation in organic synthesis [J]. *Bioresource Technol*, 2000, 74: 49-62.
- [2] 杨世海, 刘家源, 于 博, 等. 掌叶大黄细胞悬浮系统和根培养系统对鬼臼毒素的生物转化研究 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 763-766
- [3] 韩斌青, 冯 冰, 马百平. 皂苷的生物转化研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1664-1668
- [4] 崔玉娜, 张怡轩, 赵余庆. 利用生物转化制备稀有人参皂苷的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 676-680
- [5] 王 宇, 戴传超. 内生真菌对生物活性物质代谢转化作用的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1496-1499
- [6] Dong H J, Jiang B H, Han Y, *et al.* Transformation of compound K from saponins in leaves of *Panax notoginseng* by immobilized β -glucanase [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 41-47.
- [7] Riva S. Biocatalytic modification of natural products [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5: 106-111.
- [8] Liu C X, Xiao P G, Peng Y, *et al.* Challenges in research and development of traditional Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2009, 1(1): 1-28
- [9] 陈秋实, 陈孟兰, 范 晶. 青蒿素提取研究进展 [J]. 武汉生物工程学院学报, 2007, 3(2): 120-124
- [10] Yadav J S, Sathesh B R, Sabitha G. Stereoselective total synthesis of (+)-artemisinin [J]. *Tetrahedron Lett*, 2003, 44: 387-389
- [11] Brown G D, Sy L K. *In vivo* transformations of dihydroartemisinic acid in *Artemisia annua* plants [J]. *Tetrahedron*, 2004, 60: 1139-1159
- [12] Eelco Wallaart T, Uden W V, Heidi G M, *et al.* Isolation and identification of dihydroartemisinic acid from *Artemisia annua* and its possible role in the biosynthesis of artemisinin [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62: 430-433
- [13] Kawamoto H, Asada Y, Sekine H, *et al.* Biotransformation of artemisinic acid by cultured cells of *Artemisia annua* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 48: 1329-1333
- [14] 贾秀山, 廖宇静, 于飞飞, 等. 黄花蒿组织培养研究 [J]. 生物技术通讯, 2008, 19(2): 259-262
- [15] Nancy A. Semisynthesis of 3- β -hydroxyartemisinin [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62: 790-793

不同处理对药用紫苏种子萌发特性的影响

张春平¹, 何 平^{1*}, 何俊星¹, 喻泽莉¹, 杜丹丹¹, 胡世俊²

(1 西南大学生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715; 2 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要: 目的 通过对紫苏种子形态和萌发特性的研究, 寻找打破种子休眠、提高种子萌发率的适宜条件。方法 观察种子外部形态, 对紫苏种子千粒质量、净度、含水量和吸水率等多项指标进行测定, 对紫苏种子分别进行超声、低温和热水预处理, 分析不同温度、不同浓度化学物质和不同萌发介质处理对种子萌发率的影响。结果 紫苏种子的含水量为 9.09%, 吸水率为 42.84%, 经过 60℃ 热水和 4℃/5 d 预处理后的萌发率分别为 91.2% 和 90.1%。GA₃ 200 mg/L 和 PEG 200 mg/L 处理后的萌发率分别为 94.6% 和 91.1%, 较高浓度的 NAA 和 6-BA 对种子萌发具有明显的抑制效应, 变温下 (15℃/23℃) 种子萌发率为 94.7%, 滤纸和纱布介质上的萌发率分别为 94.2% 和 91.2%。结论 种皮是限制种子萌发的主要因素, 先用 60℃ 热水对种子进行预处理, 然后再用 GA₃ 200 mg/L 处理种子, 可以在短时间内显著地提高种子的萌发率, 种子萌发的最佳温度为 15℃/23℃, 最佳发芽介质为双层滤纸。

关键词: 紫苏; 种皮; 吸水率; 萌发率

中图分类号: R282.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)08-1361-05

Effects on germination characteristics with different treatments for seeds of medicinal plant *Perilla frutescens*

ZHANG Chun-ping¹, HE Ping¹, HE Jun-xing¹, YU Ze-li¹, DU Dan-dan¹, HU Shi-jun²

(1 School of Life Sciences, Southwest University, Key Laboratory (Ministry of Education) of Ecvironments of Three Gorges Reservoir Region, Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources Research for Three Gorges Reservoir Region, Chongqing 400715, China; 2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: Objective To break the dormancy and improve the germination rate of *Perilla frutescens*

* 收稿日期: 2009-11-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070080)

作者简介: 张春平 (1982-), 男, 山东潍坊人, 博士, 主要从事植物资源学与植物分子生物学等方面的研究。

Tel: 13667652727 E-mail: chunpingzhang520@163.com

* 通讯作者 何 平 Tel: (023) 68254122 E-mail: heping196373@126.com