

转基因何首乌毛状根生物转化青蒿酸的研究

朱建华¹, 于荣敏^{1,2*}

1. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632

2. 暨南大学 中药生物技术研究所, 广东 广州 510632

摘要:目的 利用转基因何首乌 *Polygonum multiflorum* 毛状根对青蒿酸进行生物转化研究, 分离鉴定其转化产物。方法 何首乌毛状根预培养 7 d, 投入青蒿酸, 培养 2 d, 终止反应, 利用 TLC 和 GC-MS 对转化产物进行检测, 利用硅胶柱、ODS 反相柱和 Sephadex LH-20 柱色谱对转化产物进行分离纯化, 并根据理化数据和波谱技术鉴定转化产物的化学结构。结果 青蒿酸在何首乌毛状根中发生了转化反应, 经 GC-MS 检测可生成多种青蒿素类化合物。分离鉴定了 2 个转化产物: 异青蒿内酯 (1) 和 3 β -羟基青蒿酸 (2), 利用 GC-MS 鉴定了另外 2 个转化产物: 去氧青蒿素 B (3) 和青蒿内酯 (4)。结论 本实验首次利用转基因植物器官对青蒿酸进行生物转化研究, 得到 3 个青蒿素类化合物和 1 个羟基化产物。该研究一方面填补了转基因植物器官对青蒿素类化合物生物转化的空白, 另一方面也丰富了转基因何首乌毛状根的化合物转化类型。

关键词: 何首乌毛状根; 生物转化; 青蒿酸; 青蒿内酯; 3 β -羟基青蒿酸

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)06-1065-03

Biotransformation of artemisinic acid by transgenic hairy roots of *Polygonum multiflorum*

ZHU Jian-hua¹, YU Rong-min^{1,2}

1. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2. Biotechnology Institute of Chinese Materia Medica, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Objective To investigate the biotransformation of artemisinic acid by transgenic hairy roots of *Polygonum multiflorum* and identify the transformation products. **Methods** Artemisinic acid was added to the suspension of transgenic hairy roots of *P. multiflorum* which had been pre-cultured for 7 d and co-cultured for another 2 d. The biotransformation products were detected by TLC and GC-MS, isolated by various chromatographic methods, and identified by physicochemical analyses and spectral data. **Results** GC-MS results showed that artemisinic acid could be biotransformed to many kinds of artemisinic compounds in the suspension of transgenic hairy roots of *P. multiflorum*. Two biotransformed products, isoannulide (1) and 3 β -hydroxyartemisinic acid (2), were isolated. In addition, deoxyarteannuin B (3) and annulide (4) were determined by GC-MS. **Conclusion** It is the first time to biotransform artemisinic acid by transgenic organs and to obtain three artemisinic compounds and one hydroxylation product, which fills the gaps in biotransformation of artemisinic compounds by transgenic organs and also enriches compound types of transgenic hairy roots of *P. multiflorum*.

Key words: transgenic hairy roots of *Polygonum multiflorum* Thunb.; biotransformation; artemisinic acid; annulide; 3 β -hydroxy-artemisinic acid

青蒿酸属倍半萜酸类成分, 与抗疟药物青蒿素具有相似的化学结构骨架, 均为杜松烷型倍半萜^[1]。据报道, 青蒿酸可能为青蒿素生物合成途径的中间体之一, 其量在黄花蒿体内远远高于青蒿素^[2-4]。因此, 利用青蒿酸作为起始物来合成青蒿素类化合物引起了研究人员的极大关注^[5-6]。

在前期工作中, 本课题组对其培养条件、化学成分、转化能力等进行了大量的研究^[7-10]。结果表明转基因何首乌毛状根培养体系中具有丰富的酶体系, 可以催化多种反应, 如糖基化反应、还原反应、羟基化反应等^[9-10]。迄今为止, 尚未见用转基因植物器官对青蒿酸进行生物转化的报道。为了系统研

收稿日期: 2012-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81073004, 81102771)

作者简介: 朱建华 (1982—), 女, 广东罗定人, 讲师, 主要从事天然活性成分生物合成与生物转化工作。

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

究青蒿酸在转基因培养体系中的代谢情况, 本实验采用转基因何首乌毛状根培养物对青蒿酸进行生物转化研究, 并分离鉴定其转化产物。

1 材料与仪器

雷磁 PHS—25 数显 pH 计(上海精密科学仪器有限公司); LDZX—40BI 型立式自动压力蒸气灭菌锅(上海申安医疗器械厂); HZQ—QX 全温振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司); Burker Advance 400 MHz 核磁共振波谱仪(Bruker 公司); Trace METM 型 GC-MS(美国菲尼根公司); 薄层色谱硅胶(青岛海洋化工厂); ODS(YMC 公司); Sephadex LH-20(Pharmacia 公司); 其余试剂均为分析纯。

青蒿酸由本研究组从黄花蒿叶中分离得到^[11], 经 HPLC 检验其质量分数 >95%。何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 毛状根系由本实验室用发根农杆菌 LBA9402 感染何首乌无菌苗叶片诱导获得^[6]。

2 方法

2.1 何首乌毛状根悬浮培养体系的建立

何首乌毛状根的诱导及鉴定见文献方法^[7]。所用培养基为 MS 培养基(不含激素), 蔗糖质量浓度为 30 g/L, 将 pH 调至 5.75, 121 °C 灭菌 20 min。控制接种量为每 100 mL 培养基毛状根鲜质量 5 g(折合干质量约为 0.5 g)。于黑暗条件下 25 °C 振荡培养, 摇床转速为 110 r/min。预培养 7 d 后用于生物转化实验。

2.2 生物转化方法

取 2 瓶毛状根悬浮培养物, 无菌环境下加入 0.5 mL 质量浓度为 10 mg/mL 的青蒿酸乙醇溶液; 另取 2 瓶培养物, 于无菌环境下加入相同体积的乙醇溶液作为空白对照。相同条件下共培养 2 d。

2.3 转化产物的检测

将终止反应后的何首乌毛状根悬浮培养物与培养基抽滤分开。培养物置于 55 °C 烘箱中烘干至恒重后, 于研钵中粉碎, 称质量。然后用 10 倍的甲醇冷浸 12 h, 超声提取 30 min, 重复提取 3 次。将甲醇提取物用水混悬, 以等体积的醋酸乙酯萃取 3 次, 合并醋酸乙酯萃取液。水层再用正丁醇萃取 3 次, 合并萃取液。培养基浓缩到一定体积后, 分别用醋酸乙酯和正丁醇萃取 3 次, 得到培养基的醋酸乙酯及正丁醇萃取部分。空白对照组操作同上。用 TLC 及 GC-MS 法对上述样品进行检测。GC-MS 条件: DB-5 弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 载气为氦气, 分流比 20:1, 柱前压 11.4 Pa。程序升温: 初始温度 80 °C, 温度保持 1 min, 以

4 °C/min 的速率升温至 206 °C, 然后以 3 °C/min 升温至 230 °C, 最后以 15 °C/min 升温至 300 °C, 保持 20 min。MS 源温度为 230 °C。

2.4 转化产物的分离纯化

向 20 瓶培养物中加入青蒿酸 600 mg, 继续培养 2 d 后对其进行处理(方法同“2.3”项), 得醋酸乙酯层萃取液。经硅胶柱、ODS 以及 Sephadex LH-20 柱色谱, 得化合物 1 和 2。

3 结果

3.1 转化产物的分离鉴定

化合物 1: 无色油状物; EI-MS m/z : 232 $[M]^+$, 192, 149, 121, 79。¹H-NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ : 6.54 (1H, t, $J = 2.8$ Hz, H-13 α), 5.64 (1H, t, $J = 2.8$ Hz, H-13 β), 5.49 (1H, brs, H-3), 4.88 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 1.84 (3H, s, H-15), 0.90 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-14); ¹³C-NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ : 40.8 (C-1), 26.8 (C-2), 124.1 (C-3), 130.9 (C-4), 74.7 (C-5), 39.4 (C-6), 38.6 (C-7), 30.4 (C-8), 34.8 (C-9), 29.6 (C-10), 140.0 (C-11), 166.3 (C-12), 129.2 (C-13), 20.1 (C-14), 18.4 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 1 为异青蒿内酯。

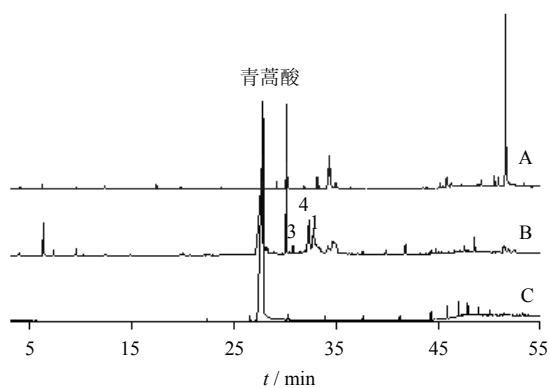
化合物 2: 无色针状结晶(氯仿); ESI-MS m/z : 273 $[M+Na]^+$, 249 $[M-H]^-$ 。¹H-NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ : 0.97 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-14), 1.74 (3H, s, H-15), 2.27 (1H, dd, $J = 14, 2.0$ Hz, H-2), 3.94 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-3 α), 5.16 (1H, s, H-5), 5.54 (1H, s, H-13 α), 6.34 (1H, s, H-13 β); ¹³C-NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ : 41.9 (C-1), 35.5 (C-2), 67.2 (C-3), 137.2 (C-4), 123.6 (C-5), 39.5 (C-6), 43.1 (C-7), 26.8 (C-8), 36.5 (C-9), 29.4 (C-10), 144.5 (C-11), 168.3 (C-12), 124.5 (C-13), 20.6 (C-14), 21.1 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 2 为 3 β -羟基青蒿酸。

3.2 转化产物的 GC-MS 鉴定

由图 1 可见, 与空白对照组(A)相比, 转化实验组(B)产生了很多新峰, 说明青蒿酸在转基因何首乌毛状根培养体系中成功地发生了生物转化。对峰面积较大的 3 个峰的质谱图进行了检索, 并与文献对比^[11], 确定这 3 个峰均为青蒿素类化合物, 推测为去氧青蒿素 B(3)、青蒿内酯(4)和异青蒿内酯(1)。

4 讨论

青蒿酸在转基因何首乌毛状根中成功地发生了转化, 形成 2 种代谢物: 青蒿素类化合物及其羟基



A-空白对照组 B-转化组 C-底物(青蒿酸)

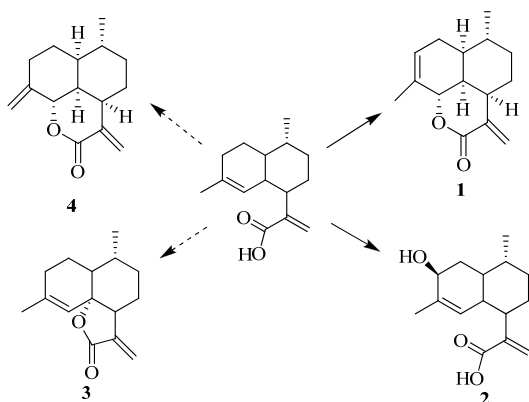
A-blank control group B-biotransformation group C-substrate (artemisic acid)

图1 青蒿酸在何首乌毛状根培养体系中生物转化GC-MS图
Fig. 1 GC-MS chromatograms of artemisic acid biotransformed by hairy roots of *P. multiflorum*

化合物, 说明转基因何首乌毛状根培养物含有丰富的酶体系, 可以催化多种反应。实验采用对青蒿素类化合物灵敏的 GC-MS 法检测转化产物的生成。从图 1 明显观察到去氧青蒿素 B (3)、青蒿内酯 (4) 和异青蒿内酯 (1) 的色谱峰, 而未观察到 3 β -羟基青蒿酸 (2) 的色谱峰。其原因可能是与化合物 3、4 和 1 相比, 2 的极性更大, 在此色谱条件下难以出现。

青蒿酸投入到转基因何首乌毛状根培养体系后, 在环合酶的作用下可生成化合物 3, 在双键转移酶及环合酶的共同作用下可生成化合物 1 和 4, 在羟基转移酶的作用下可生成化合物 2。其可能的生物合成途径见图 2。

本实验为首次利用转基因植物器官对青蒿酸进



实心箭头为分离鉴定的产物, 虚线箭头为 GC-MS 鉴定的产物
Solid arrows mean compounds isolated and dashed arrows mean compounds determined by GC-MS

图2 转基因何首乌毛状根对青蒿酸的生物转化
Fig. 2 Biotransformation of artemisic acid by hairy roots of *P. multiflorum*

行的生物转化研究, 该研究一方面填补了植物器官对青蒿素类化合物生物转化的空白, 另一方面也丰富了转基因何首乌毛状根的转化类型。在本研究中, 分离鉴定了 2 个转化产物: 异青蒿内酯 (1) 和 3 β -羟基青蒿酸 (2); 利用 GC-MS 鉴定了另外 2 个转化产物: 去氧青蒿素 B (3) 和青蒿内酯 (4)。该研究结果表明转基因何首乌毛状根除了可以催化羟基化反应、糖基化反应及还原反应^[8-9]外, 还可以催化环合反应及双键移位。

参考文献

- [1] Kawamoto H, Asada Y, Sekine H, *et al.* Biotransformation of artemisic acid by cultured cells of *Artemisia annua* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 48: 1329-1333.
- [2] Zhang Y S, Keat H T, Darwin W, *et al.* The molecular cloning of artemisic aldehyde δ 11 (13) reductase and its role in glandular trichome-dependent biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 21501-21508.
- [3] Sangwan R S, Agarwal K, Luthra R, *et al.* Biotransformation of arteannuic acid into arteannuin-B and artemisinin in *Artemisia annua* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 34: 1301-1302.
- [4] Gupta M M, Jain D C, Mathur A K, *et al.* Isolation of a high artemisic acid containing plant of *Artemisia annua* [J]. *Planta Med*, 1996, 62: 280-281.
- [5] Han J, Lee J G, Min S S, *et al.* Synthesis of new artemisinin analogues from artemisic acid modified at C-3 and C-13 and their antimalarial activity [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64: 1201-1205.
- [6] 唐煜, 朱建华, 于荣敏. 黄花蒿悬浮培养细胞对二氢青蒿酸的生物转化研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(8): 1358-1361.
- [7] 王莉, 于荣敏, 张辉, 等. 何首乌毛状根的诱导及其培养 [J]. *药物生物技术*, 2002, 9(2): 110-114.
- [8] 马娜, 董权锋, 叶皇琦, 等. 何首乌毛状根中萜醌类成分的分离鉴定 [J]. *中药材*, 2009, 32(7): 1031-1033.
- [9] 严春艳, 马伟丽, 颜雯雯, 等. 何首乌毛状根对倍半萜类化合物 furannoligularenone 的生物转化研究 [J]. *中药材*, 2008, 31(5): 633-635.
- [10] 邓文娟, 周良彬, 于荣敏. 转基因何首乌毛状根生物转化瑞香素的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(3): 351-355.
- [11] Vonwiller S C, Haynes R K, King G, *et al.* An improved method for the isolation of qinghao (artemisic) acid from *Artemisia annua* [J]. *Planta Med*, 1993, 59(6): 562-563.
- [12] Brown G D, Sy L K. *In vivo* transformations of artemisic acid in *Artemisia annua* plants [J]. *Tetrahedron*, 2007, 63(38): 9548-9566.
- [13] Zhu J H, Yu R M, Yang L, *et al.* Novel biotransformation processes of dihydroartemisic acid and artemisic acid to their hydroxylated derivatives by two plant cell culture systems [J]. *Process Biochem*, 2010, 45: 1652-1656.