

加兰他敏和石杉碱甲生物合成的研究进展

谢 峻^{1*}, 张静怡^{1#}, 汤 宁², 柯江英³, 赵 嵩⁴, 姜泽慧⁴

1. 马鞍山师范高等专科学校 食品工程系, 安徽 马鞍山 243041

2. 马鞍山师范高等专科学校 教师教育系, 安徽 马鞍山 243041

3. 马鞍山天福康药业有限公司, 安徽 马鞍山 243000

4. 马鞍山市食品药品检验中心, 安徽 马鞍山 243000

摘 要: 植物来源的加兰他敏、石杉碱甲等乙酰胆碱酯酶抑制剂 (AChEIs) 以其高效低毒的优势成为当前临床治疗阿尔茨海默病的主流药物。由于目前加兰他敏、石杉碱甲等 AChEIs 尚未实现工业化合成, 故仍主要依赖植物提取。然而, 药源植物培育周期长、难度大, 药效物质含量低, 随着社会需求的急剧攀升, 供求矛盾日益突出。开发新替代资源以及利用现代基因工程技术合成加兰他敏、石杉碱甲等 AChEIs 是缓解当前矛盾的有效途径。对近年来加兰他敏和石杉碱甲生物合成的相关研究进展进行综述, 总结了替代资源的开发研究现状, 以期挖掘加兰他敏、石杉碱甲等 AChEIs 优势新资源及利用代谢工程合成药效物质研究提供参考。

关键词: 乙酰胆碱酯酶抑制剂; 阿尔茨海默病; 加兰他敏; 石杉碱甲; 生物合成

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)03-0812-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.035

Advances in biosynthesis of galanthamine and huperzine A

XIE Jun¹, ZHANG Jing-yi¹, TANG Ning², KE Jiang-ying³, ZHAO Song⁴, JIANG Ze-hui⁴

1. Department of Food Engineering, Maanshan Teacher's College, Maanshan 243041, China

2. Department of Teachers' Education, Maanshan Teacher's College, Maanshan 243041, China

3. Maanshan Tianfukang Pharmaceutical Co., Ltd., Maanshan 243000, China

4. Maanshan Food and Drug Inspection Center, Maanshan 243000, China

Abstract: Acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) isolated from plants have become the mainstream of clinical treatment for Alzheimer's disease because of their high efficiency and low toxicity. At present, the production of galantamine and huperzine A still mainly rely on plant extraction since they are not chemically synthesized on a large scale in industry. However, with the sharp rise of social demand, the contradiction between supply and demand has become increasingly prominent due to the difficulty in cultivation and the poor abundance of effective substances. Developing new alternative resources and taking the advantage of metabolic engineering for the production of AChEIs such as galantamine and huperzine are the efficient ways to alleviate the current contradiction. Here, the current development status of alternative resources was summarized and the progress of biosynthesis of galantamine and huperzine A during the past few years was reviewed.

Key words: acetylcholinesterase inhibitors; Alzheimer's disease; galanthamine; huperzine A; biosynthesis

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种严重的中枢神经系统疾病, 其临床表现为痴呆综合征, 以记忆减退、认知障碍、人格变性为特征, 严重影响老年人的身体健康和生活质量。文献报道表明^[1], AD 是继心脑血管疾病和肿瘤之后, 导致老

年人死亡的最大病因。根据国际阿尔茨海默病协会 (Alzheimer's disease international, ADI) 2015 年公布的数据^[2], 全球有 4 680 万 AD 患者, 而我国是 AD 患者人数增速最快的国家之一, 1990 年尚不足 200 万人, 2010 年已接近 600 万人, 位居世界前列。

收稿日期: 2019-08-25

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究项目 (KJ2019A1202); 安徽省高校优秀青年人才支持计划项目 (gxyqZD2019111)

作者简介: 谢 峻 (1981—), 男, 硕士生导师, 副教授, 博士, 从事食药生物技术与生化工程研究。Tel: (0555)8215935 E-mail: xjljxchq@126.com

#并列第一作者 张静怡 (1998—), 女, 大专在读, 从事食品营养与卫生研究。E-mail: 610876321@qq.com

植物来源可用于治疗 AD 的药物主要包括加兰他敏 (galanthamine)、石杉碱甲 (huperzine A)、银杏叶提取物、红景天、花色苷等。乙酰胆碱酯酶抑制剂 (AChEIs) 是当前临床治疗 AD 的主流方法, 代表性的 AChEIs 有加兰他敏、石杉碱甲、卡巴拉汀 (rivastigmine)、他克林 (tacrine) 等。加兰他敏和石杉碱甲具有治疗范围广、毒副作用小、耐受性好等优点, 但却因为化学合成步骤繁杂、条件苛刻、成本高、收率低、环境污染严重等问题, 一直未实现工业化规模生产^[3-4], 故仍主要从植物中提取。然而, 植物资源生长周期长、难度大, 药效物质丰度低, 野生药材资源过度开发及生境破坏, 导致生产成本居高不下。随着中国老龄化社会的到来, 供求关系将愈发紧张。近年来为缓解传统药材资源压力, 挖掘新的优势替代资源或借助代谢工程合成加兰他敏、石杉碱甲等 AChEIs 成为当前研究的热点。

1 石蒜科生物碱 (Amaryllidaceae alkaloids, AAs) 加兰他敏、力可拉敏 (lycoramine) 和石蒜碱 (lycorine) 在资源植物中的分布

加兰他敏在石蒜科 (Amaryllidaceae) 石蒜属 *Lycoris* Herb. 植物中含量相对较高, 且我国石蒜属植物种类繁多、分布广泛同属于 AAs 的 AChEIs 还包括力可拉敏、石蒜碱、网球花胺 (haemanthamine) 等。虽然力可拉敏等 AAs 的乙酰胆碱酯酶抑制活性不及加兰他敏, 但它们共同分享了由降孤挺花定 (norbelladine) 生成 4'-O-甲基降孤挺花定的上游生物合成通路, 因此, 阻断各代谢支流, 可促进代谢流向加兰他敏富集。国内外已发现含有加兰他敏的植物资源包括水仙属 *Narcissus* L.、石蒜属、雪滴花属 *Galanthus* Linn.、葱莲属 *Zephyranthes* Herb.、雪片莲属 *Leucojum* L.、水鬼蕉属 *Hymenocallis* Salisb.、文殊兰属 *Crinum* L. 等 (表 1)。我国石蒜科石蒜属植物种质资源丰富^[24]。洪山海等^[8]和袁菊红等^[9]比较了我国石蒜科石蒜属和石蒜科水仙属植物中的加兰他敏含量, 研究结果提示, 石蒜属植物中加兰他敏、力可拉敏和石蒜碱含量较高。在不同产地石蒜属 13 种 1 变种石蒜及中国水仙 *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem. 共 17 份样品中, 安徽石蒜 *L. anhuiensis* Y. Xu et G. J. Fan 中力可拉敏和加兰他敏的总量最高, 其中加兰他敏的质量分数约为 3.46 mg/g, 是红花石蒜 *L. radiata* (L'Her.) Herb. 中的 6.2 倍, 忽地笑 *L. aurea* Herb. 中的 1.5 倍, 中国水仙中的 7.5 倍。力可拉敏和加兰他敏共同分享了 N-去甲

基诺维定生物合成通路, 阻断力可拉敏支流, 促进代谢流向加兰他敏富集, 因而从代谢合成的角度看, 安徽石蒜是进一步培育为高产加兰他敏的潜力资源。

2 石杉碱甲在资源植物中的分布

石杉碱甲仅在石杉科 (Huperziaceae) 中石杉属 *Huperzia* Bernh. 和马尾杉属 *Phlegmariurus* (Herter) Holub 植物中含有, 且马尾杉属植物较石杉属植物中石杉碱甲含量更加丰富。目前, 石杉碱甲为我国一线治疗 AD 药物 (如双益平)。此外, 朱大元等^[25]以石杉碱甲为原料半合成了选择性更高、毒性更小的新一代治疗 AD 的药物 ZT-1 (希普林)。

受限于药源种类、生长区域、采集季节、采收方法等多方面因素, 石杉碱甲等活性石松碱类生物碱 (lycopodium alkaloids, LAs) 的得率良莠不齐。以蛇足石杉 *H. serrata* (Thunb.) Trev. 中的石杉碱甲为例^[26-29], 石杉碱甲在蛇足石杉中全年含量上下浮动, 入秋时节含量较高, 而在冬末至春末则较低; 蛇足石杉组织分析表明其叶中石杉碱甲含量较高, 茎其次, 根和孢子囊含量较低; 马尾杉属中石杉碱甲含量普遍较石杉属高。此外, Ma 等^[27]研究表明蛇足石杉在潮湿环境中生长更有利于石杉碱甲的积累, 而王德立等^[30]则认为较多的降雨并不利于石杉碱甲的积累。Ma 等^[27]在石杉属 26 种、1 变种、2 变型和马尾杉属 11 种中筛选后发现, 石杉属中四川石杉 *H. sutchueniana* (Herter) Ching 中石杉碱甲的质量分数最低, 约 46.85 $\mu\text{g/g}$, 锡金石杉 *H. herteriana* (Kümmerle) T. Sen et U. Sen 中石杉碱甲的质量分数最高, 约 254.58 $\mu\text{g/g}$, 石杉属石杉碱甲平均质量分数约为 103.82 $\mu\text{g/g}$; 马尾杉属中云南马尾杉 *P. yunnanensis* Ching 中石杉碱甲的质量分数最低, 约 241.84 $\mu\text{g/g}$, 龙骨马尾杉 *P. Carinatus* (Desv.) Ching 中石杉碱甲的质量分数最高, 达到 560.46 $\mu\text{g/g}$, 马尾杉属石杉碱甲平均质量分数约为 357.44 $\mu\text{g/g}$, 接近石杉属平均值的 3.5 倍, 差异显著。Ma 等^[31]进一步对石杉科下的石杉属和马尾杉属以及石松目 (Lycopodiales) 下的石松属 *Lycopodium* L.、小石松属 *Lycopodiella* Holub、垂穗石松属 *Palhinhaea* Franco et Vasc. ex Vasc. et Franco.、扁枝石松属 *Diphasiastrum* Holub 以及藤石松属 *Lycopodiastrum* Holub ex Dixit 中的 LAs 作了化学分类分析, 结果发现, 仅石杉属和马尾杉属中能检测到石杉碱甲。

石杉碱甲资源植物生长缓慢, 从孢子萌发到成

表 1 加兰他敏、力可拉敏和石蒜碱在资源植物中的分布

Table 1 Content of galanthamine, lycoramine, and lycorine in resource plants

植物	加兰他敏		力可拉敏		石蒜碱		产地	采收时间	参考文献
	部位	含量	部位	含量	部位	含量			
多花水仙亚种 <i>Narcissus tazetta</i> L. sub sp. <i>tazetta</i>	鳞茎	0.005 1%	—	—	鳞茎	0.025 0%	土耳其穆拉	花期	5
	地上	0.005 5%	—	—	地上	0.067 2%			
多花水仙 <i>N. tazetta</i> L.	鳞茎、根、叶、花、茎	nd	—	—	鳞茎	170.74 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	印度喜马偕尔邦	2015 年 1 月	6
			—	—	叶	242.55 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	烟达拉		
纸白水仙 <i>N. papyraceus</i> Ker. -Gaul.	—	—	—	—	—	0.12%	中国上海	—	7
中国水仙	—	0.005%	—	—	—	—	中国福建龙海	—	8
	—	—	—	—	—	0.1%	中国浙江杭州	—	7
	—	—	—	—	—	0.01%	中国福建厦门		
红花石蒜	鳞茎	0.46 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	0.28 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	3.79 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	中国福建漳州	花谢后 2 周	9
	—	—	—	—	—	0.02%	中国上海	—	7
	微量	—	—	—	—	—	中国广西	—	8
	鳞茎	0.56 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	1.58 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	4.02 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	中国江苏宜兴	花谢后 2 周	9
	鳞茎	0.98 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	3.43 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	8.30 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	—	—	10
	花	0.23 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	花	2.07 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	花	7.44 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$			
换锦花	鳞茎	2 065.79 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	—	—	—	—	中国江苏南京	7 月, 叶枯后休眠期	11
	鳞茎	0.86 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	2.62 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	3.57 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	中国江苏宜兴	花谢后 2 周	9
忽地笑	—	—	—	—	—	0.005%	中国上海	—	7
	—	0.034%	—	—	—	—	中国云南	—	8
	鳞茎	2.24 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	0.20 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	5.59 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	中国江苏南京	花谢后 2 周	9
	鳞茎	0.046%	鳞茎	0.044%	鳞茎	0.042%	中国江苏南京	1977 年 8 月, 开花初期	12
	鳞茎	473.51 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	0.17 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	140.01 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	中国江苏南京	—	13
安徽石蒜	鳞茎	2.56 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	1.24 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	3.14 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	中国江苏南京	花谢后 2 周	9
	鳞茎	3.46 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	2.20 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	鳞茎	3.61 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	中国安徽滁州		
中国石蒜 <i>L. chinensis</i> Traub	种仁	671.33 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	种囊	383.62 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	根毛	505.85 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	中国江苏南京	2008 年 11 月—2009 年 5 月	14
沃氏雪滴花 <i>Galanthus woronowii</i> L.	—	0.003%~0.506%	—	—	—	0.008%~0.364%	土耳其东北部	花期	15
佛斯特雪滴花 <i>G. fosteri</i> Baker	地上	0.008 8%	—	—	鳞茎	0.004 5%	土耳其阿马西亚	果期/花期	16
大花雪滴花 <i>G. elwesii</i> Hook. f.	—	—	—	—	地上	0.006%~0.162%	土耳其西部	花期	17
					鳞茎	0.130%~0.055%			
<i>G. trojanus</i> A. P. Davis & Ozhatay	—	—	—	—	鳞茎	0.012%	土耳其恰纳卡莱	花期	18
<i>G. cilicicus</i> Baker	地上、鳞茎	0.015%~0.016%	—	—	地上、鳞茎	≤0.004%	土耳其伊切儿	花期	18
韭莲 <i>Zephyranthes grandiflora</i> Lindl.	+	—	—	—	—	—	捷克萨德斯卡	—	19
	鳞茎	63.72 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	—	—	鳞茎	225.36 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	中国重庆忠县	—	20
夏雪片莲 <i>Leucojum aestivum</i> L.	—	—	—	—	—	0.46%	中国浙江杭州	—	7
	—	19.416 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	—	—	—	—	波兰	—	21
水鬼蕉 <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Scalib.	—	—	—	—	鳞茎	2.54 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	马来西亚槟州	—	22
					根	0.71 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$			
文殊兰属 12 种植物	—	≤721.3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	—	—	—	≤3 717.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	印度	—	23

nd-未检测到 —文献中未提供相关数据 +已表征但未定量

nd-not detected —data not provided +-characterized but not quantified

熟通常需要 15~20 年。代表性物种蛇足石杉中石杉碱甲的含量虽不高^[32],但作为传统中药,其需求量大、认可度高且分布地域相对广泛,因而遭到了掠夺性采收,资源日渐匮乏。因此,国内外开展了一系列石杉碱甲资源植物的繁育方法研究^[33-39],并逐步建立起较为高效的体外扩繁方法,这些方法一方面将以非合成但可持续的方式为石杉碱甲的生产提供宝贵的资源,另一方面也将为利用代谢工程生产石杉碱甲奠定基础。此外,张小红等^[39]通过前体饲喂发现,添加适量赖氨酸能够促进蛇足石杉中石杉碱甲的积累。但与此矛盾的是,陈曼^[40]认为添加赖氨酸反而会抑制石杉碱甲的积累。

近年来,以产石杉碱甲的石杉科植物内生真菌分离、发酵及其生物合成研究日渐兴起^[41-42],这可能是解决石杉碱甲药物资源的又一有效途径。

3 加兰他敏和石杉碱甲的生物合成

3.1 加兰他敏的生物合成

石蒜科植物中分离得到了近 500 个生物碱类化合物,其分子骨架主要由苄基和苄乙胺 2 部分组合而成,故 AAs 又被称为苄基苄乙胺类生物碱。AAs 按结构类型主要分为石蒜碱型(lycorine-type)、文殊兰碱型(crinine-type)、加兰他敏型(galanthamine-type)、水仙花碱型(tazettine-type)、水鬼蕉碱型(pancratistatintype)、高石蒜碱型(homolycorine-type)、孤挺花定型(belladine-type)等^[43]。国内外研究推测^[44-45],以加兰他敏为代表的 AAs 的上游生物合成途径可能衍生自苯丙氨酸和酪氨酸代谢通路^[46-47],而在随后的次生代谢途径中,先由降孤挺花定 4'-O-甲基转移酶(N4OMT)催化 AAs 通用中间代谢物降孤挺花定生成 4'-O-甲基降孤挺花定^[48-51];之后,分流进入不同的分支途径^[52],如在对位 C-C 苯酚耦合细胞色素作用下^[53-54],经 noroxomaritidine 生成网球花胺等;经 noroxopluvine 生成石蒜碱等;经 N-去甲基诺维定(N-demethylnarwedine)生成力可拉敏和加兰他敏等(图 1)。然而,有关加兰他敏生物合成关键起始反应的报道极少。2018 年, Singh 等^[55]首次将黄水仙 *N. pseudonarcissus* 'King Alfred' 转录组数据与多种植物中的去甲乌药碱合酶(NCS)同源比对后克隆并验证了黄水仙降孤挺花定合酶基因(NpNBS)。研究证实, NpNBS 的原核表达重组蛋白具有体外催化 3,4-二羟基苯甲醛(3,4-dihydroxybenzaldehyde, 3,4-DHBA)和酪胺(tyramine)缩合生成降孤挺花定的作用。此外, Singh

等^[55]还发现 NpNBS 基因在黄水仙的鳞茎、根、茎、叶、花组织中的表达模式与 AAs 在上述组织中的积累模式高度一致。

近年来,石蒜科水仙属植物遗传转化的成功案例频现^[56-58];石蒜科石蒜属红花石蒜^[59]、乳白石蒜 *L. albiflora* Koidz.^[60]、忽地笑^[61]、换棉花 *L. sprengeri* Comes ex Baker^[62]、稻草石蒜 *L. straminea* Lindl.^[63]、安徽石蒜^[64]等也相继建立起离体快繁体系或悬浮细胞系^[65];甚至有成功利用根癌农杆菌介导对红花石蒜遗传转化的报道^[66]。由此看来,利用代谢工程优选出高产加兰他敏及 AAs 的石蒜种质资源指日可待。

3.2 石杉碱甲的生物合成

石松碱类植物中分离得到了超过 240 个天然石松碱类生物碱,其分子骨架主要由 C₁₆N 或 C₁₆N₂ 组成的三环或四环化合物,也有少量骨架为 C₁₁N、C₂₂N₂ 或者 C₂₇N₃ 骨架。LAs 按结构类型主要分为 4 大类,即石松碱类(lycopodines)、石松定碱类(lycodines)、伐斯替明碱类(fawcettimines)和以马尾杉碱类(phlegmarines)为主的其他类^[67]。目前,基本意见一致的是, LAs 的上游生物合成始于赖氨酸脱羧酶(LDC)催化赖氨酸脱羧基生成尸胺(cadaverine)^[68-70]。事实上,人们在研究喹诺里西啉类生物碱(QAs)生物合成的过程中,已经通过同位素示踪实验证实了赖氨酸在 LDC 的作用下脱羧生成了尸胺^[71-72]。LDC 基因相继从产 LAs 的石松 *L. clavatum* L.^[73]、长柄石杉 *H. serrata* (Thunb. ex Murray) Trev. var. *longipetiolata* (Spring) H. M. Chang、华南马尾杉 *Phlegariurus austrosinicus* (Ching) L. B. Zhang^[74]、蛇足石杉^[73,75-76]等植物以及蛇足石杉内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14^[77]中分离得到(图 2)。杜次等^[77]从蛇足石杉中获得的 2 条同源性达 95.3%的 LDC 基因(GeneBank 登录号 JQ308624、JQ308625),分别只编码 212 个和 202 个氨基酸,半定量 RT-PCR 分析表明 LDC 在根、茎、叶中表达量无明显差异,但不同组织内石杉碱甲含量差异显著。彭思露等^[78]从蛇足石杉内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14 中克隆了 LDC 基因(GeneBank 登录号 KT362170),其编码 228 个氨基酸。Bunsupa 等^[73]从石松中获得了 1 条编码 500 个氨基酸的 LDC 基因(DDBJ 登录号 AB915695)以及从蛇足石杉中获得 2 条分别编码 507、509 个氨基酸的 LDC 基因(DDBJ 登录号 AB915696 和 AB915697)。Xu 等^[76]也从蛇

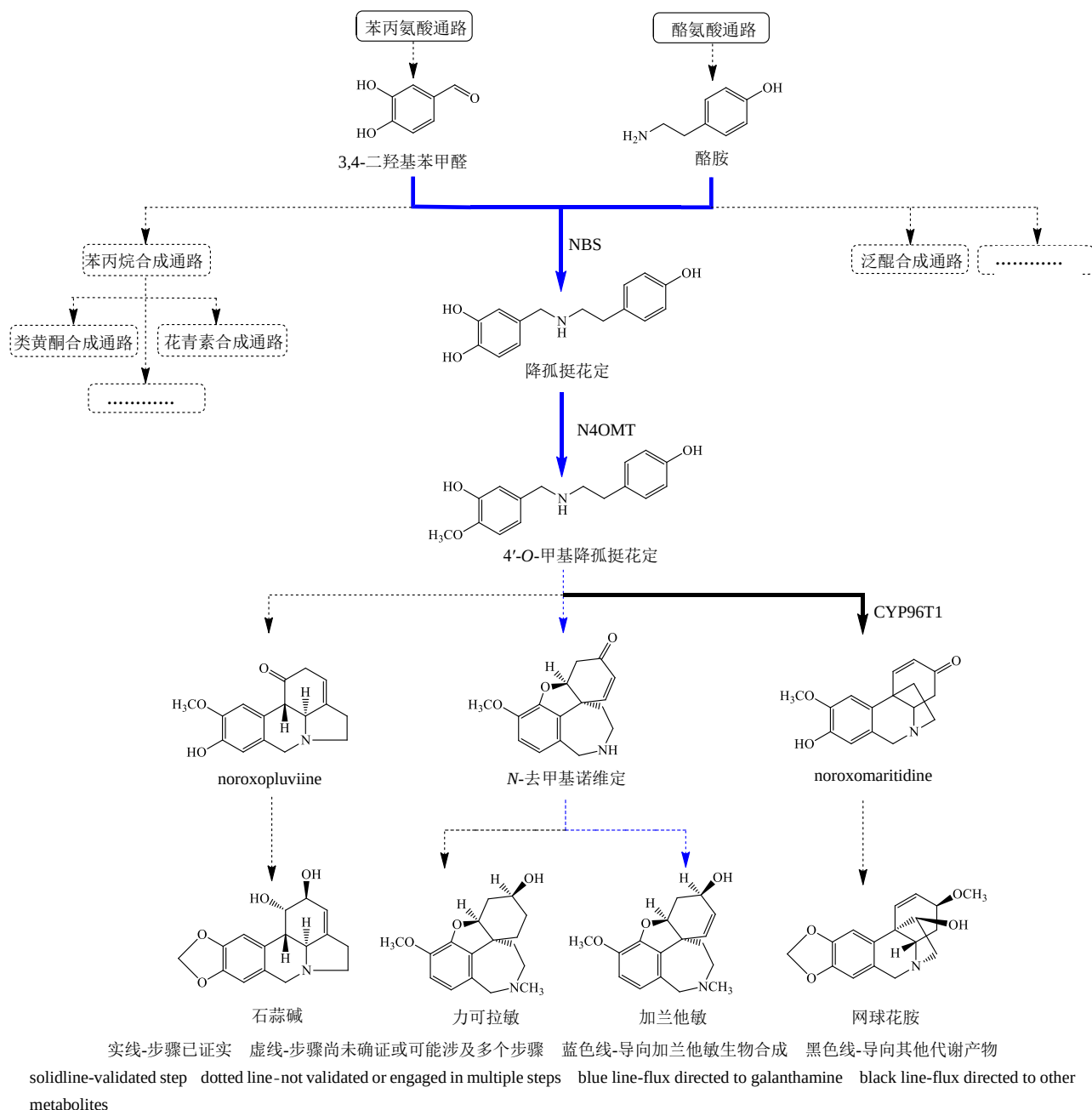
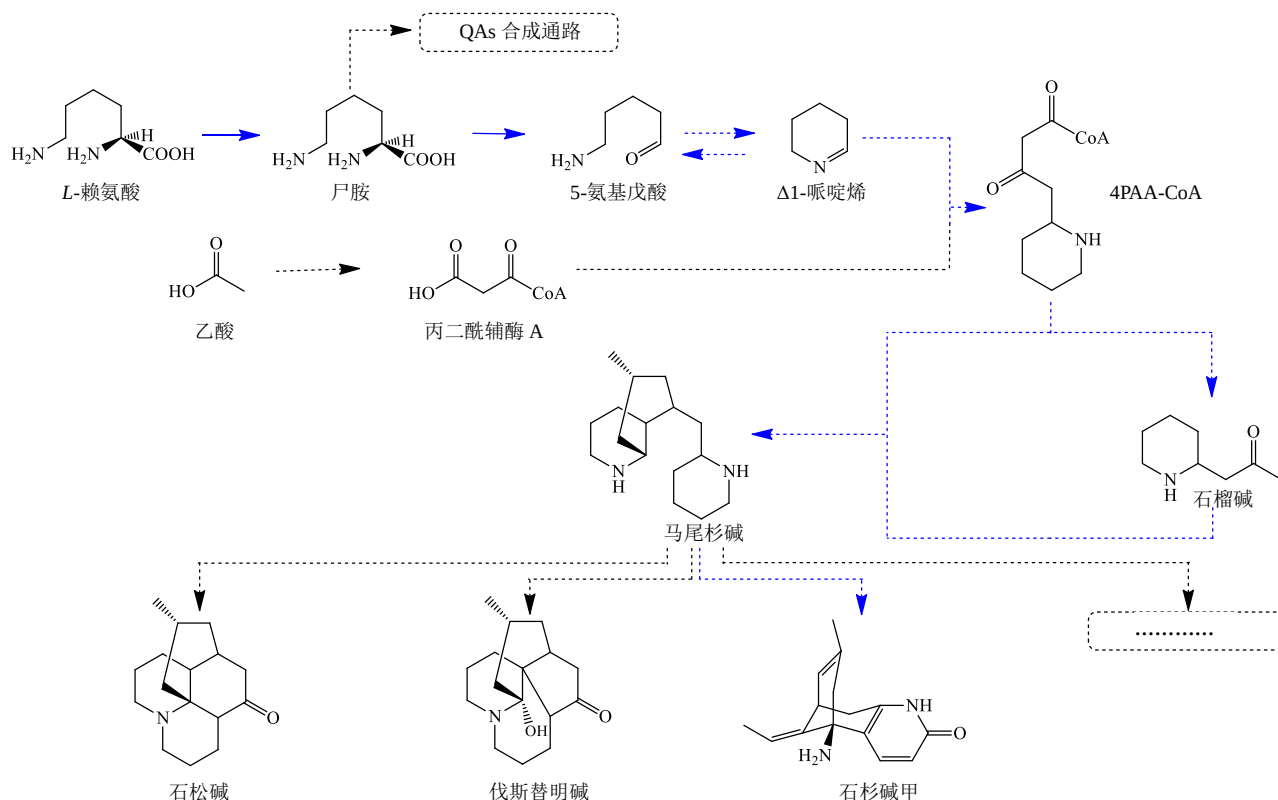


图 1 加兰他敏生物合成途径推测

Fig. 1 Putative biosynthetic pathway of galanthamine

足石杉中获得了 6 条核酸相似性达 95%、氨基酸相似性达 98% 的 LDC 基因, 以其中 1 条 (HsLDC-X1) 为例, 其 1 530 bp 的全长 cDNA 包含了 1 个 1 407 bp 的开放阅读框, 编码 469 个氨基酸。虽然 Xu 等^[76]发现其所获得的 LDC HsLDC-X1 的蛋白序列与 Bunsupa 等^[73]所获得的 LDC BAR42911.1、BAR42912.1 和 BAR42913.1 的蛋白序列仅有 70% 的相似性, 但二者意见基本一致, 即 LcLDC 或 HsLDC 具有催化赖氨酸脱羧和鸟氨酸脱羧的双功

能, 且 LcLDC 或 HsLDC 催化赖氨酸的效率更高; 转 LcLDC 或 HsLDC 基因植株中的尸胺含量会显著提高; LDC 基因家族在由祖先 ODC 向 LDC 长期的进化过程中, 形成了众多有益突变或剪切的拷贝, 增强了 LDC 功能, 并逐步分别在产 QAs、LAs 等物种中固定下来。此外, LDC 基因家族成员的复杂性和多样性, 可能还在于其形成的多拷贝在不同物种中亚细胞结构的定位不同, 使其在各亚细胞器内演化出不同的功能, 以应对植物在生长、发育以及



实线-步骤已证实 虚线-步骤尚未确证或可能涉及多个步骤 蓝色线-导向石杉碱甲生物合成 黑色线-导向其他代谢产物
solidline-validated step dotted line-not validated or engaged in multiple steps blue line-flux directed to huperzine A black line-flux directed to other metabolites

图 2 石杉碱甲生物合成途径推测

Fig. 2 Putative biosynthetic pathway of huperzine A

适应外界环境所需要的不同作用^[79]。

在由 LDC 催化赖氨酸生成尸胺之后,可能由铜胺氧化酶 (CAO) 催化脱氨基生成 5-氨基戊醛 (5-aminopentanal), 并自发地环化为 Δ^1 -哌啶烯 (Δ^1 -piperidine)。目前,铜胺氧化酶基因也相继从产蛇足石杉 (GeneBank 登录号 JN247732)^[80]以及从蛇足石杉内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14 (GeneBank 登录号 KT362171)^[81]中分离得到。

Yang 等^[81]发现,虽然 *Shiraia* sp. Slf14 中编码 677 个氨基酸的 SsCAO 含有与 Sun 等^[80]从蛇足石杉中编码 681 个氨基酸的 HsCAO 相同的 Asn-Tyr-Asp/Glu 保守区,但两者的序列相似度并不高。相反, SsCAO 却与番茄匍柄霉 *Stemphylium lycopersici* 的 CAO 密切相关。由此提示,在内生真菌和其宿主,不论是 LDC 还是 CAO,其基因都非简单的水平转移。

另外,初生代谢物乙酸经一系列反应生成丙二酰辅酶 A (malonyl-CoA) 后,一部分与 Δ^1 -哌啶烯缩合形成 4-(2-哌啶基) 乙酰乙酸辅酶 A (4PAA-

CoA), 4PAA-CoA 脱羧后生成石榴碱 (pelletierine), 另一部分再与石榴碱脱羧形成马尾杉碱 (phlegmarine, 图 2)。马尾杉碱被认为是石杉碱甲合成的前体物质,根据马尾杉碱的化学结构特征推测,在细胞色素 P450 (CYP450) 催化下^[82-83],其可形成石松定碱骨架,最后再经一系列氧化开环、脱甲基以及 N-甲基转移酶 (N-MTs) 催化后分别形成以石杉碱甲为代表的多类 LAs。

4 展望

近年来,国内外逐步解析了植物中有关加兰他敏和石杉碱甲生物合成的大致轮廓,然而具体的生物合成途径,特别是下游的具体步骤仍不清楚。此外,有关石蒜属和石杉属植物遗传转化研究也鲜有报道。随着分子生物学和代谢组学的发展,综合利用基因过表达或敲除、基因编辑、稳定同位素标记等多方面技术剖析加兰他敏和石杉碱甲的生物合成机制,同时构建高效的石蒜属和石杉属植物组培快繁和遗传转化体系,将为借助代谢工程合成加兰他

敏和石杉碱甲、缓解药物供求矛盾、保护自然资源和生态环境奠定扎实基础。

参考文献

- [1] Lendon C L, Ashall F, Goate A M. Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics [J]. *JAMA-J Am Med Assoc*, 1997, 277(10): 825-831.
- [2] Sandyk R. Serotonergic mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Int J Neurosci*, 2006, 116(7): 775-826.
- [3] 姜 芳. (-)-加兰他敏的合成研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2018.
- [4] Ferreira A, Rodrigues M, Fortuna A, et al. Huperzine A from *Huperzia serrata*: A review of its sources, chemistry, pharmacology and toxicology [J]. *Phytochem Rev*, 2016, doi: 10.1007/s11101-014-9384-y.
- [5] Karakoyun Ç, Ünver-Somer N. Simultaneous quantitative analysis of biologically important Amaryllidaceae alkaloids in *Narcissus tazetta* L. sub sp. *tazetta* by HPLC/PDA [J]. *J Res Pharm*, 2019, 23(3): 498-505.
- [6] Katoch D, Sharma U. Simultaneous quantification and identification of Amaryllidaceae alkaloids in *Narcissus tazetta* by ultra performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed*, 2019, 175: 112750.
- [7] 洪山海, 陈政雄, 李静芬. 石蒜科生物碱的研究 II 假石蒜碱的新分离法和石蒜碱高含量植物的寻找 [J]. *药理学学报*, 1962, 9(12): 719-724.
- [8] 洪山海, 李静芬, 马广恩. 石蒜科生物碱的研究 IV 加兰他敏生产工艺及高含量植物的寻找 [J]. *中国药理学杂志*, 1979(8): 372-373.
- [9] 袁菊红, 胡绵好, 夏 冰. 石蒜属不同种间生物碱含量差异性研究 [J]. *江西农业大学学报*, 2010, 32(3): 560-565.
- [10] 李明凯, 张玉琼, 董召荣, 等. 高效液相色谱法测定石蒜中加兰他敏、力可拉敏及石蒜碱 3 种生物碱 [J]. *分析测试学报*, 2012, 31(8): 957-961.
- [11] 李青竹, 蔡友铭, 张永春, 等. UPLC-MS/MS 法快速分析换锦花中加兰他敏的动态积累变化 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17(3): 1011-1018.
- [12] 吕芝香, 周维西, 徐向荣. 南京地区两种石蒜不同生长期中石蒜碱、加兰他敏和力可拉敏含量的比较 [J]. *植物生理学通讯*, 1979(1): 25-29.
- [13] 李青竹, 张永春, 郑玉红, 等. 超高效液相色谱-四极杆线性离子阱质谱法同时检测石蒜属 3 种生物碱 [J]. *分析测试学报*, 2018, 37(2): 211-216.
- [14] Mu H, Wang R, Li X, et al. Alkaloid accumulation in different parts and ages of *Lycoris chinensis* [J]. *Z Naturforsch C*, 2010, doi: 10.1515/znc-2010-7-80765c: 458-462.
- [15] Emir A, Polat D C, Kaya G I, et al. Simultaneous determination of lycorine and galanthamine in *Galanthus woronowii* by HPLC-DAD [J]. *Acta Chromatogr*, 2013, 25(4): 755-764.
- [16] Emir A, Onur M A. Simultaneous quantification of galanthamine and lycorine in *Galanthus fosteri* by HPLC-DAD [J]. *J Res Pharm*, 2016, 20: 320-324.
- [17] Emir A, Emir C, Bozkurt B, et al. Application of HPLC-DAD for the quantification of Lycorine in *Galanthus elwesii* Hook [J]. *Braz J Pharm Sci*, 2017, 53(1): e15063.
- [18] Kaya G I, Polat D C, Sarikaya B, et al. Quantitative determination of lycorine and galanthamine in *Galanthus trojanus* and *G. cilicicus* by HPLC-DAD [J]. *Nat Prod Commun*, 2014, 9(8): 1157-1158.
- [19] Cahliková L, BValterová I, Macáková K, et al. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity [J]. *Rev Bras Farmacogn*, 2011, 21(4): 575-580.
- [20] 冯 巍, 谈 锋, 谢 峻, 等. 韭莲组培快繁及其石蒜碱和加兰他敏积累的研究 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2008, 30(12): 134-138.
- [21] Schumann A, Berkov S, Claus D, et al. Production of galanthamine by *Leucojum aestivum* shoots grown in different bioreactor systems [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 167(7): 1907-1920.
- [22] Subramaniam S, Sundarasekar J, Sahgal G, et al. Comparative analysis of lycorine in wild plant and callus culture samples of *Hymenocallis littoralis* by HPLC-UV Method [J]. *Sci World J*, 2014, doi: 10.1155/2014/408306408306.
- [23] Ghane S G, Attar U A, Yadav P B, et al. Antioxidant, anti-diabetic, acetylcholinesterase inhibitory potential and estimation of alkaloids (lycorine and galanthamine) from *Crinum* species: An important source of anticancer and anti-Alzheimer drug [J]. *Ind Crop Prod*, 2018, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.08.087.
- [24] 谢 峻, 谈 锋, 冯 巍, 等. 石蒜属植物分类鉴别、药用成分及生物技术应用研究进展 [J]. *中草药*, 2007, 38(12): 1902-1905.
- [25] 朱大元, 唐焱灿, 林金来, 等. 一类海克林碱衍生物及它的用途: 中国, CN1125725 A [P]. 1996-07-03.
- [26] 王 峻, 吴 伟, 潘胜利. HPLC 法测定 6 种石蒜科植物中石杉碱甲的含量 [J]. *中草药*, 2003, 34(7): 607-608.
- [27] Ma X, Tan C, Zhu D, et al. Is there a better source of

- huperzine A than *Huperzia serrata*? Huperzine A content of Huperziaceae species in China [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(5): 1393-1398.
- [28] 赵晓丹. 千层塔依存环境与石杉碱甲积累量季节变化关系的研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2006.
- [29] 黄 骥, 赵爱玲. 蛇足石杉中石杉碱甲含量的动态变化分析 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(19): 2511-2515.
- [30] 王德立, 甘炳春, 齐耀东, 等. 蛇足石杉不同生长阶段植株中石杉碱甲含量的地区差异及生境影响的比较观察 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(3): 326-332.
- [31] Ma X, Tan C, Zhu D, et al. Huperzine A from *Huperzia* species-an ethnopharmacological review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113(1): 15-34.
- [32] Ma X, Tan C, Zhu D, et al. A survey of potential huperzine A natural resources in China: The Huperziaceae [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 104(1/2): 54-67.
- [33] 沈晓霞, 俞旭平, 盛束军. 千层塔茎尖组织培养灭菌方法的研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(6): 458-459.
- [34] Szypuła W, Pietrosiuk A, Suchocki P, et al. Somatic embryogenesis and *in vitro* culture of *Huperzia selago* shoots as a potential source of huperzine A [J]. *Plant Sci*, 2005, doi: 10.1016/j.plantsci.2004.12.021.
- [35] Ma X, Gang D R. *In vitro* production of huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimer's disease [J]. *Phytochemistry*, 2008, doi: 10.1016/j.phytochem.2008.04.017.
- [36] Szypuła W J, Mistrzak P, Olszowska O. A new and fast method to obtain *in vitro* cultures of *Huperzia selago* (Huperziaceae) sporophytes, a club moss which is a source of huperzine A [J]. *Acta Soc Bot Pol*, 2013, 82(4): 313-320.
- [37] 徐贤柱, 涂艺声, 吉枝单, 等. 蛇足石杉离体培养物形态变化与石杉碱甲积累的研究 [J]. 植物学报, 2015, 50(6): 733-738.
- [38] 吉枝单, 涂艺声, 陈 曼, 等. 蛇足石杉离体培养产石杉碱甲的条件优化及动力学研究 [J]. 中草药, 2016, 47(3): 488-492.
- [39] 张小红, 李晓君, 杨雪飞, 等. 不同条件对蛇足石杉组培苗生长及石杉碱甲积累的影响 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(4): 472-477.
- [40] 陈 曼. 添加不同氨基酸培养对蛇足石杉叶状体的增殖和石杉碱甲累积与抗氧化酶响应的研究 [D]. 南昌: 江西师范大学, 2016.
- [41] 鞠 鏊. 四种石杉科植物中产生石杉碱甲的内生真菌的分离、鉴定和其石杉碱甲含量的测定 [D]. 上海: 复旦大学, 2009.
- [42] 唐承晨, 张 纯, 王吉永, 等. 药用植物蛇足石杉内生菌研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(7): 13-19.
- [43] Jin Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids [J]. *Nat Prod Rep*, 2007, doi: 10.1039/B502163B.
- [44] Jeffs P W, Campbell H F, Farrier D S, et al. Biosynthesis of mesembrine and related alkaloids, mode of incorporation of phenylalanine, and examination of norbelladines as precursors [J]. *J Am Chem Soc D: Chem Commun*, 1971, 5(5): 228-230.
- [45] Eichhorn J, Takada T, Kita Y, et al. Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(4): 1037-1047.
- [46] Li W, Yang Y, Qiao C, et al. Functional characterization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase-encoding genes from *Lycoris radiata*, a galanthamine-producing plant [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.046.
- [47] Wang R, Han X, Xu S, et al. Cloning and characterization of a tyrosine decarboxylase involved in the biosynthesis of galanthamine in *Lycoris aurea* [J]. *Peer J*, 2019, doi: 10.7717/peerj.6729.
- [48] Kilgore M B, Augustin M M, Starks C M, et al. Cloning and characterization of a norbelladine 4'-O-methyltransferase involved in the biosynthesis of the Alzheimer's drug galanthamine in *Narcissus* sp. aff. *pseudonarcissus* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103223.
- [49] 梁丽建, 江玉梅, 夏 冰, 等. 石蒜儿茶酚氧位甲基转移酶基因克隆与原核表达 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(1): 23-28.
- [50] 桂柳姿, 崔培梧, 潘清平, 等. 忽地笑加兰他敏生物合成代谢途径中 COMT 酶基因克隆及序列分析 [J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(3): 35-40.
- [51] 别庆玲, 徐 晟, 傅江燕, 等. 一个新的忽地笑 O-甲基转移酶基因的克隆与原核表达 [J]. 植物生理学报, 2014, 50(5): 651-659.
- [52] Singh A, Desgagne-Penix I. Transcriptome and metabolome profiling of *Narcissus pseudonarcissus* 'King Alfred' reveal components of Amaryllidaceae alkaloid metabolism [J]. *Sci Rep-UK*, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-17724-0.
- [53] Kilgore M B, Augustin M M, May G D, et al. CYP96T1 of *Narcissus* sp. aff. *pseudonarcissus* catalyzes formation of the para-para' C-C phenol couple in the Amaryllidaceae alkaloids [J]. *Front Plant Sci*, 2016, doi: 10.3389/fpls.2016.00225.
- [54] Sun B, Wang P, Wang R, et al. Molecular Cloning and characterization of a meta/para-O-methyltransferase from *Lycoris aurea* [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, doi: 10.3390/ijms19071911.
- [55] Singh A, Massicotte M A, Garand A, et al. Cloning and

- characterization of norbelladine synthase catalyzing the first committed reaction in Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis [J]. *BMC Plant Biol*, 2018, doi: 10.1186/s12870-018-1570-4.
- [56] 常乐, 夏宜平, 孙晓杰. 石蒜属植物再生体系与鳞茎花卉遗传转化体系研究进展 [J]. 华北农学报, 2009, 24(增刊): 76-80.
- [57] 曾荣华, 陈亮, 沈明山, 等. 农杆菌介导的中国水仙遗传转化体系的建立 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2001, 40(5): 1145-1150.
- [58] 秦军, 潘腾飞, 郭志雄, 等. 多花水仙花色基因与遗传转化研究进展 [J]. 福建农业科技, 2016(4): 59-65.
- [59] 朱景存, 张玉琼, 刘春滢, 等. 石蒜组织培养和植株再生的研究 [J]. 生物学杂志, 2010, 27(6): 46-48.
- [60] 刘志高, 童再康, 储家森, 等. 乳白石蒜组织培养 [J]. 浙江林学院学报, 2006, 23(3): 347-350.
- [61] 郭兆武, 郭旭春, 高建芳, 等. 黄花石蒜不同外植体的组织培养研究 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(8): 1695-1700.
- [62] 姚丽娟, 杨燕萍, 徐晓薇, 等. 3种观赏石蒜的离体快速繁殖 [J]. 浙江农业科学, 2009(4): 688-690.
- [63] 龙祥友, 孙长生. 稻草石蒜的组织培养与快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(12): 1207-1208.
- [64] 姜自红. 安徽石蒜组培快繁体系的建立 [J]. 安徽农业科学, 2018, 46(31): 85-87.
- [65] 张玉琼, 陈娜, 周建辉, 等. 石蒜悬浮细胞系的建立及其生物碱累积的研究 [J]. 中草药, 2013, 44(24): 3540-3545.
- [66] 虞剑平, 蒋兴邨, 邵启全. Ti质粒基因在单子叶植物石蒜和金针菜中的表达 [J]. 遗传学报, 1989, 16(3): 174-177.
- [67] 王锋鹏. 生物碱化学 [M]. 北京: 化学工业出版社. 2008.
- [68] Hemscheidt T, Spenser I D. Biosynthesis of lycopodine: Incorporation of acetate via an intermediate with C_{2v} symmetry [J]. *J Am Chem Soc*, 1993, doi: 10.1021/ja00060a078.
- [69] Ma X Q, David R G. The *Lycopodium* alkaloids [J]. *Nat Prod Rep*, 2004, doi: 10.1039/b409720n.
- [70] 陈作毅, 张君诚. 石杉碱生物合成与代谢途径研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(6): 1815-1818.
- [71] Hartmann T, Schoofs G, Wink M. A chloroplast-localized lysine decarboxylase of *Lupinus polyphyllus* [J]. *FEBS Lett*, 1980, 115(1): 35-38.
- [72] Bunsupa S, Katayama K, Ikeura E, et al. Lysine decarboxylase catalyzes the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis and coevolved with alkaloid production in Leguminosae [J]. *Plant Cell*, 2012, doi: 10.1105/tpc.112.095885.
- [73] Bunsupa S, Hanada K, Maruyama A, et al. Molecular evolution and functional characterization of a bifunctional decarboxylase involved in *Lycopodium* alkaloid biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2016, doi: 10.1104/pp.16.00639.
- [74] 宋育红, 陈作毅, 张君诚. 长柄石杉L-赖氨酸脱羧酶基因克隆及序列分析 [J]. 中草药, 2015, 46(21): 3228-3234.
- [75] 杜次, 李菁, 唐云涛, 等. 蛇足石杉赖氨酸脱羧酶基因的克隆、原核表达及其功能分析 [J]. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1299-1307.
- [76] Xu B, Lei L, Zhu X, et al. Identification and characterization of L-lysine decarboxylase from *Huperzia serrata* and its role in the metabolic pathway of *Lycopodium* alkaloid [J]. *Phytochemistry*, 2017, 136: 23-30.
- [77] 杜次, 李菁, 田向荣, 等. 湘西蛇足石杉不同部位石杉碱甲分布及与LDC表达的关系 [J]. 中药材, 2013, 36(3): 361-364.
- [78] 彭思露, 杨慧林, 朱笃, 等. 蛇足石杉内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14 中赖氨酸脱羧酶基因的克隆、表达及功能 [J]. 微生物学报, 2016, 56(4): 698-707.
- [79] Huang J L, Gu M, Lai Z B, et al. Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153: 1526-1538.
- [80] Sun J, Morita H, Chen G, et al. Molecular cloning and characterization of copper amine oxidase from *Huperzia serrata* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(18): 5784-5790.
- [81] Yang H, Peng S, Zhang Z, et al. Molecular cloning, expression, and functional analysis of the copper amine oxidase gene in the endophytic fungus *Shiraia* sp. Slf14 from *Huperzia serrata* [J]. *Protein Express Purif*, 2016, doi: 10.1016/j.pep.2016.07.013.
- [82] Luo H M, Li Y, Sun C, et al. Comparison of 454-ESTs from *Huperzia serrata* and *Phlegmariurus carinatus* reveals putative genes involved in *Lycopodium* alkaloid biosynthesis and developmental regulation [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, doi: 10.1186/1471-2229-10-209.
- [83] Luo H M, Sun C, Li Y, et al. Analysis of expressed sequence tags from the *Huperzia serrata* leaf for gene discovery in the areas of secondary metabolite biosynthesis and development regulation [J]. *Physiol Plant*, 2010, 139(1): 1-12.