植物资源与环境学报 2004, 13(2): 14 - 16
*Journal of Plant Resources and Environment*

# 人参细胞生物合成熊果苷转化体系的建立

栗建明, 丁家宜, 李 正, 蔡 洁, 张媛媛
(中国药科大学中药生物技术研究室 江苏 南京 210038)

**摘要** 以人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)培养细胞为生物反应体系,利用外源氢醌为底物,对熊果苷的生物合成进行了研究。TLC 鉴别表明,人参细胞可以将外源的氢醌转化为熊果苷;以熊果苷含量和氢醌的转化率为指标,对人参细胞生物合成熊果苷的基本条件(氢醌浓度、转化持续时间、细胞培养阶段)进行了探讨,结果表明,MS 固体培养基上培养 32 d 的人参细胞,在含有 2 mmol·$L^{-1}$氢醌的生物合成培养基中转化 24 h 后,合成的熊果苷含量占细胞干重的 7.176%,氢醌转化率也达到 79.15%。

**关键词**: 人参细胞;生物合成;氢醌;熊果苷
**中图分类号**: Q943.1; S567.5+1 **文献标识码**: A **文章编号**: 1004-0978(2004)02-0014-03

**Establishment of biotransformation system of the arbutin biosynthesis by cultured *Panax ginseng* cells**

LI Jian-ming, DING Jia-yi, LI Zheng, CAI Jie, ZHANG Yuan-yuan (Research Department of Herb Biotechnology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2004, **13**(2): 14 - 16

**Abstract**: Using hydroquinone as a substrate, the arbutin biosynthesis was investigated by *Panax ginseng* C. A. Mey. cell suspension culture. The result of identification of TLC indicated that *P. ginseng* cells were able to convert hydroquinone into arbutin. Based on the content of arbutin and the transformation rate of hydroquinone, these basic conditions (such as hydroquinone concentration, lasting time and the culture stage) were studied for biosynthesis arbutin by *P. ginseng* cell. The results showed that the content of arbutin and the transformation rate of hydroquinone were 7.176% and 79.15% respectively when *P. ginseng* cells cultured in MS medium for 32 d were transferred in biotransformation medium containing 2 mmol · $L^{-1}$ hydroquinone and incubated 24 h.

**Key words**: *Panax ginseng* C. A. Mey. cells; biosynthesis; hydroquinone; arbutin

生物转化是利用生物体系将加入到反应系统中的外源有机底物某一特定部位或功能基团进行特异性的结构修饰以获得有价值的不同化学产物的工艺[1]。目前已知离体培养植物细胞具有酯化、氧化、葡萄糖基化、异构化、甲基化、去甲基化、乙酰化等多种生物转化能力[2]。氢醌(1,4-对苯二酚)是酪氨酸酶的抑制剂,但刺激性强,副作用大,仅在临床上限量使用。将其转化为熊果苷后,水溶性增强,毒性也降低,天然的熊果苷来自越橘(*Vaccinium vitisideae* L.)、腹水草〔*Veronicastrum stenostachyum* (Hemsl.) Yamazaki〕、鸡矢藤〔*Paederia scandens* (Lour.) Merr.〕等植物[3~6],未见存在于人参属(*Panax* C. A. Mey.)植物中的报道。目前已经成功利用人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)毛状根将氢醌生物转化为熊果苷[7],并对转化产物进行了分离与鉴定[8]。本文以人参细胞作为生物反应体系,将外源氢醌转化为熊果苷,并对氢醌浓度、转化持续时间及细胞培养阶段进行了分析,以期为人参细胞合成熊果苷的工厂化生产及应用提供实验数据和资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与试剂

德国 Christ L-1 型冷冻干燥机;岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪;岛津 SPD-10Avp UV-VIS 检测器;$C_{18}$ shim-pack VP-ODS 色谱柱 150mm × 4.6mm I. D.;硅胶板(青岛海洋化工厂);熊果苷标准品(SIGMA 公司);氢醌(分析纯,含量 98% 以上);乙腈(色谱纯);水(重蒸水);其余试剂均为分析纯。

**收稿日期**: 2004-01-05
**作者简介**: 栗建明(1974 - ),男,山西原平人,硕士,主要从事药用植物生物技术的研究。

### 1.2 人参细胞生物合成熊果苷实验方法

1.2.1 人参细胞的培养　人参细胞由本实验室提供,在MS固体培养基上培养,45～50 d继代1次。培养温度(25±1)℃,暗培养。

1.2.2 生物合成培养基的配制　配制0.2 mol·$L^{-1}$氢醌溶液,在无菌条件下,以0.25 μm的微孔滤膜过滤,按实验所需浓度,取其续滤液加入到已灭菌的50 mL MS液体培养基中,摇匀备用,该培养基需现配现用。

1.2.3 熊果苷的生物合成　称取培养至一定阶段的人参细胞10 g,置于已配制好的50 mL生物合成培养基中,以上述温度,在转速为100 r·$min^{-1}$的摇床上继续悬浮暗培养24 h。实验时间为2003.9－2003.12。

1.2.4 熊果苷的薄层鉴别　将转化后的人参细胞低温冷冻干燥,研成粉末,取0.5 g加甲醇10mL超声提取30 min,过滤,水浴蒸干,残渣加1 mL甲醇溶解,作为样品溶液。取该溶液进行硅胶薄层色谱,展开剂$V$(氯仿):$V$(甲醇):$V$(水)=7:3:0.4,展开后挥干溶剂,碘蒸汽显色。以未转化的人参细胞和1 mg·$mL^{-1}$的熊果苷标准品溶液作为对照。

1.2.5 熊果苷含量测定　参照文献[7]的方法进行。熊果苷标准曲线为$A = 4.0\times10^{6}\ C - 1771.6$($r = 0.9998$),其中,$A$为峰面积,$C$为样品浓度。精密度为0.601 9%。每组实验用6瓶细胞,每次测定取2个平行试样。

1.2.6 氢醌转化率计算　氢醌转化率/%=(转化后细胞中所含的熊果苷摩尔数/加入培养基中的氢醌摩尔数)×100%。

### 1.3 转化条件的筛选

1.3.1 不同氢醌浓度的筛选　取固体培养基上培养40 d的人参细胞10 g,置于氢醌含量为0.5、1.0、2.0、4.0和8.0 mmol·$L^{-1}$的生物合成培养基中,培养24 h,分析熊果苷含量及转化率。实验重复2次。

1.3.2 转化持续时间的比较　取固体培养基上培养36 d的人参细胞10 g,在含有2 mmol·$L^{-1}$氢醌的生物合成培养基上分别转化1、2、3、4和5 d,分析熊果苷含量及转化率。实验重复2次。

1.3.3 不同细胞培养阶段的比较　取培养14、19、24、28、32、36、40和45 d的人参细胞各10 g,在含有2 mmol·$L^{-1}$氢醌的生物合成培养基上转化24 h,分析熊果苷含量及转化率。实验重复2次。

## 2 结果与分析

### 2.1 熊果苷合成的TLC鉴别

TLC鉴别结果表明,样品溶液在与熊果苷标准品溶液相对应的位置上有相同颜色的斑点,而作为阴性对照的未转化人参细胞却没有该斑点,说明人参细胞能够将氢醌转化成熊果苷。

### 2.2 不同底物浓度对熊果苷合成的影响

不同底物浓度对人参细胞熊果苷合成的影响结果见表1。可以看出,当氢醌浓度为2 mmol·$L^{-1}$时,所合成的熊果苷含量最高,达6.892%,而氢醌的转化率也较高,达到79.06%。随着氢醌浓度的增加,熊果苷含量以及氢醌的转化率均下降,这是由于培养基中氢醌浓度较低时,对细胞的正常代谢影响较小,随着氢醌浓度的增高,对细胞的毒性增加,酶的活力也受到影响的缘故。当底物浓度为1 mmol·$L^{-1}$时,虽然转化率较高,但熊果苷含量较低,故在以后的实验中,氢醌浓度均为2 mmol·$L^{-1}$。

**表1 不同氢醌浓度对人参细胞熊果苷合成的影响**
**Table 1 Effect of different concentrations of Hydroquinone on arbutin biosynthesis of *Panax ginseng* C. A. Mey. cells**

| 氢醌浓度/mmol·$L^{-1}$ Hydroquinone concentration | 熊果苷含量/% Content of arbutin | 转化率/% Transformation rate |
|---|---|---|
| 0.5 | 1.383±0.223 | 65.08 |
| 1.0 | 3.644±0.274 | 89.22 |
| 2.0 | 6.892±0.270 | 79.06 |
| 4.0 | 4.856±0.264 | 25.71 |
| 8.0 | 3.538±0.282 | 8.88 |

### 2.3 转化持续时间对熊果苷合成的影响

不同转化时间对人参细胞熊果苷合成的影响见表2。可以看出,转化1 d,熊果苷的含量已达6.840%,氢醌转化率达到77.06%,而到第5天时熊果苷的含量略为降低,表明持续转化24 h较合适。

### 2.4 人参细胞不同培养阶段对熊果苷合成的影响

人参细胞的不同培养阶段对熊果苷合成的影响见表3。有研究表明[9,10],离体培养的植物细胞往往在指数生长期葡萄糖基转移酶的活性达到最高值,而到静止期下降很快。由表3结果可以看出,当人参细胞处于指数生长期时,熊果苷含量和氢醌的转化率都处于较高水平,其中32 d的人参细胞中熊果苷含量达最高值7.176%,氢醌转化率也达到

79.15%。推测这应该是处于指数生长期的人参细胞中葡萄糖基转移酶的活力较高的缘故，这一结果也进一步验证了前人的结论。

**表2 转化持续时间对人参细胞熊果苷合成的影响**
**Table 2 Effect of lasting time on arbutin biosynthesis of *Panax ginseng* C. A. Mey. cells**

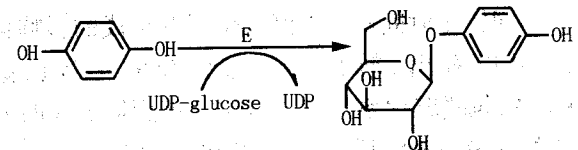
| 转化时间/d Lasting time | 熊果苷含量/% Content of arbutin | 转化率/% Transformation rate |
|---|---|---|
| 1 | 6.840±0.275 | 77.96 |
| 2 | 6.899±0.280 | 70.32 |
| 3 | 6.644±0.295 | 70.06 |
| 4 | 6.699±0.212 | 72.57 |
| 5 | 6.158±0.291 | 64.89 |

**表3 不同培养阶段对人参细胞熊果苷合成的影响**
**Table 3 Effect of different culture stages on arbutin biosynthesis of *Panax ginseng* C. A. Mey. cells**

| 培养时间/d Culture time | 熊果苷含量/% Content of arbutin | 转化率/% Transformation rate |
|---|---|---|
| 14 | 1.735±0.217 | 16.58 |
| 19 | 2.248±0.206 | 26.64 |
| 24 | 5.333±0.282 | 55.65 |
| 28 | 6.714±0.221 | 69.86 |
| 32 | 7.176±0.213 | 79.15 |
| 36 | 6.840±0.275 | 77.96 |
| 40 | 6.892±0.270 | 79.06 |
| 45 | 4.418±0.295 | 46.62 |

## 3 讨 论

1) 人参细胞能够作为一种生物反应器，将氢醌高效转化为熊果苷，这可能是在细胞中葡萄糖基转移酶的作用下，以尿苷二磷酸葡萄糖(UDP-glucose)作为高能供体，将氢醌糖基化，转化为相应的β-D-单糖苷即熊果苷(图1)。




E:葡萄糖基转移酶 Glucosyltransferase

**图1 人参细胞中熊果苷的生物合成机理**
**Fig. 1 Mechanism of arbutin biosynthesis in *Panax ginseng* C. A. Mey. cell**

2) 影响植物培养物生物转化的因素很多，如植物培养物的种类、株系、生长阶段，外源化合物的量及理化性质以及培养条件等。本文初步探讨了影响人参细胞生物转化氢醌合成熊果苷的3个基本因素：氢醌浓度、转化持续时间和细胞培养阶段，由实验可以看出，在MS固体培养基上培养32 d的人参细胞，当转移到含有2 mmol·$L^{-1}$氢醌的生物合成培养基上转化24 h，熊果苷含量可以高达细胞干重的7.176%，转化率也能达到79.15%。这为今后进一步研究熊果苷的生物合成奠定了的基础。

3) 利用植物细胞进行生物转化，生产有用的目标产物已发展成为植物细胞生物技术的重要组成部分，用于转化的底物不仅有天然的，还有人工合成的。与微生物转化系统相比，植物细胞培养作为生物转化系统还有诸多不足(如培养周期较长，可资利用的酶数量有限)，但植物细胞也有其自身的独特优势，随着研究的不断深入，这一技术将广泛应用于医药产业。

**参考文献：**

[1] 谢秀祯，郭 勇. 植物培养物生物转化系统在药物合成上的研究与应用[J]. 药物生物技术，2003，10(6)：405－408.

[2] Takayuki S, Toshifumi H. Biotransformation of exogenous substrates by plant cell cultures[J]. Phytochemistry, 1990, 29: 2393－2406.

[3] 孙 晖，王喜军，黄 睿，等. RP-HPLC法测越橘茎叶熊果苷的含量[J]. 中国中药杂志，1997，22(9)：555.

[4] 赵焕霞，刘 玥，宋 哲，等. 薄层扫描法测定7种腹水草属植物中熊果甙的含量[J]. 中国野生植物资源，1998，16(3)：30－32.

[5] 陈缵光，张 孔，莫金垣，等. 毛细管电泳安培法测定鸡矢藤中熊果苷的含量[J]. 分析化学，2002，30(7)：886.

[6] 卫莹芳，山森千彰，郭 力，等. HPLC测定川产六种鹿蹄草中高熊果苷的含量[J]. 华西药学杂志，2002，17(6)：435－436.

[7] 赵明强，丁家宜，刘 峻，等. 人参毛状根生物合成熊果苷的研究[J]. 中国中药杂志，2001，26(12)：819－820.

[8] 栗建明，丁家宜，赵明强. 人参毛状根生物合成熊果苷的分离与鉴定[J]. 植物资源与环境学报，2004，13(1)：60－61.

[9] 许建峰，苏志国，冯朴荪. 利用高山红景天培养细胞生物转化外源酪醇生产红景天甙的研究[J]. 植物学报，1998，40(12)：1129－1135.

[10] Tabata M, Ikeda F, Hiraoka N, *et al*. Glucosylation of phenolic compounds by *Datura innoxia* suspension cultures [J]. Phytochemistry, 1976, 15: 1225－1249.