

人参毛状根生物合成天麻素转化体系的建立

蔡洁, 丁家宜, 华亚男, 李楠

(中国药科大学中药生物技术教研室, 江苏南京 210038)

摘要: 以对羟基苯甲醇转化率和天麻素含量为指标, 探索适宜于人参毛状根生物合成天麻素的培养条件如底物浓度、转化持续时间和培养阶段。结果表明, B₅液体培养基培养 22 d 的人参毛状根, 在含有 1.000 mmol · L⁻¹ 对羟基苯甲醇的生物合成培养基中转化 24 h, 合成的天麻素含量占干重的 6.65%, 对羟基苯甲醇转化率达到 84.8%, 说明以人参毛状根为反应器可以合成人参所不具有的天麻素。

关键词: 人参; 毛状根; 生物合成; 天麻素; 对羟基苯甲醇

中图分类号: S567.5⁺¹; Q621.3⁺³ **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2005)02-0029-03

Establishment of biotransformation system of the gastrodin biosynthesis by hairy root of *Panax ginseng* CAI Jie, DING Jia-yi, HUA Ya-nan, Li Nan (Research Department of Herb Biotechnology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2005, 14(2): 29-31

Abstract: Using the content of gastrodin and the transformation rate of exogenous 4-hydroxybenzyl alcohol as indexes, it was carried on to research the proper biosynthesis conditions such as the substrate concentration, transformative lasting time and the culture stage of hairy root of *Panax ginseng* C. A. Mey. The results indicated that the content of gastrodin and the transformation rate of exogenous 4-hydroxybenzyl alcohol were 6.65% and 84.5% respectively when the hairy root of *P. ginseng* cultured in B₅ liquid medium for 22 d, were transformed in biotransformation medium containing 1.000 mmol · L⁻¹ 4-hydroxybenzyl alcohol and incubated 24 h. It showed that gastrodin is synthesized by the hairy root of *P. ginseng*.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Mey.; hairy root; biosynthesis; gastrodin; 4-hydroxybenzyl alcohol

利用植物离体培养细胞或器官中的一些酶体系对外源化学成分进行结构改造, 得到具有活性且毒性小的先导化合物, 进行传统有机合成所不能或很难进行的化学反应, 弥补传统有机化学合成及微生物生物转化的不足, 具有理论及实际应用价值^[1,2]。

天麻素即 4-羟基甲基苯-β-D-吡喃葡萄糖苷或对羟基甲基苯-β-D-吡喃葡萄糖苷 (4-hydroxymethylphenyl-β-D-glucopyranoside or p-hydroxymethylphenyl-β-D-glucopyranoside), 为兰科 (Orchidaceae) 植物天麻 (*Gastrodia elata* Blume) 的主要活性成分, 有镇静、抗惊厥、抗炎、镇痛及增强机体免疫功能等作用^[3]。

人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey.) 是五加科 (Araliaceae) 人参属 (*Panax* Linn.) 植物, 人参毛状根培养体系具有生长速度快、遗传性状稳定等特点。刘峻等^[4]建立了人参毛状根培养体系, 并有利用人参毛状根合成熊果苷的报道^[5,6]; 也有学者利用微

生物^[7]和悬浮细胞^[8]进行了天麻素合成的研究。本文利用人参毛状根将外源对羟基苯甲醇转化为天麻素, 以期为天麻素的工业化生产提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

天麻素标准品 (中国药品生物检定所, 批号 807-200104); 对羟基苯甲醇 (Fluca 公司); 岛津 LC10AT 高效液相色谱仪; N2000 色谱工作站; 甲醇 (色谱纯); 水 (重蒸水); 其余试剂均为分析纯。

1.2 人参毛状根生物合成天麻素方法

1.2.1 材料 人参毛状根 E₄ 株系由中国药科大学中药学院生物技术教研室提供, 在 B₅ 培养基中悬浮

收稿日期: 2004-12-07

作者简介: 蔡洁 (1980-), 女, 山西太原人, 硕士, 主要从事中药生物技术的研究。

培养,25 d 继代1次,在转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床上暗培养,温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

1.2.2 培养方法 在150 mL 摇瓶中加入75 mL B_5 培养基(pH 5.8),灭菌,每瓶接种150 mg 嫩根。

1.2.3 生物合成培养基 配制 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对羟基苯甲醇,用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,按实验所需浓度,加入到已灭菌的 B_5 液体培养基中,摇匀备用。

1.2.4 生物合成方法 每瓶人参毛状根培养至22 d,将其生长培养基更换为75 mL 含一定浓度对羟基苯甲醇的 B_5 培养基,以上述转速和温度暗培养一定时间。每处理10瓶,共重复3次。

1.2.5 天麻素的薄层鉴别 将转化后的人参毛状根冷冻干燥,研成粉末,取0.5 g 加甲醇10 mL 用超声波提取30 min,过滤,作为样品溶液进行薄层层析。薄层展开剂为:V(乙酸乙酯):V(甲醇):V(水)=9:2:0.2,显色剂为5%磷钼酸乙醇溶液。以未转化的人参毛状根和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 天麻素标准品溶液作为对照。

1.3 天麻素含量测定方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱 C_{18} shimpack VP-ODS (150 mm \times 4.6 mm I. D.); 流动相:V(甲醇):V(磷酸盐溶液):V(水)=2:3:95,磷酸盐溶液为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠的等量混合溶液;检测波长227 nm;流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量 $20 \mu\text{L}$;柱温 25°C 。

1.3.2 对照品和样品溶液制备 称取天麻素标准品5.0 mg,用甲醇溶解并定容至5 mL,摇匀,即得标准品溶液。

将转化后的人参毛状根用少量蒸馏水洗涤, -50°C 冷冻干燥,研成粉末,过80目筛,备用。精密称取粉末500 mg 于10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,超声波提取2次,每次30 min,过滤,滤液浓缩定容至10 mL,作为样品溶液。以未转化的人参毛状根为空白对照,制备方法同样品溶液。

1.3.3 测定方法

1.3.3.1 标准曲线的制备 取 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 天麻素标准品溶液1 mL,置5、10、25、50和100 mL 容量瓶中,以甲醇定容,分别取上述5种溶液 $20 \mu\text{L}$ 各重复进样3次($n=3$),记录峰面积积分值,以进样浓度 $C(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ 对峰面积平均值 A 进行线性回归,得回归方程: $A = 2 \times 10^7 C + 41\ 020$, $r = 0.999\ 8$ 。

1.3.3.2 精密度试验 取 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 天麻素标

准品溶液连续进样5次,每次 $20 \mu\text{L}$,测峰面积积分值 A , RSD 为0.6%,表明进样精密度较高。

1.3.3.3 稳定性试验 取标准品溶液 $20 \mu\text{L}$,分别于0、3、6、12和24 h 进样,测峰面积 A , RSD 为1.8% ($n=3$),表明待测溶液至少在24 h 内稳定。

1.3.3.4 重现性试验 取标准品溶液 $20 \mu\text{L}$,连续进样6次,测峰面积积分值 A , RSD 为0.8%,表明重现性好。

1.3.3.5 样品测定 取样品溶液 $20 \mu\text{L}$,连续进样3次,测定峰面积积分值 A ,用回归方程计算样品中的天麻素含量 C_b ,并由此计算出底物转化率 Br 。

$$C_b = (C_a \cdot V_1 / W_1) \times 100\%;$$

$$Br = [(C_b \cdot DW) / (M \cdot Cd \cdot nV_2)] \times 100\%.$$

其中: C_a 为样品溶液中天麻素的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); V_1 为样品溶液体积 (mL); W_1 为样品取样量 (mg); C_b 为样品中天麻素含量 (%); DW 为毛状根的干重 (mg); M 为天麻素分子量 ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$); Cd 为对羟基苯甲醇浓度 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); V_2 为每瓶培养基体积 (mL), n 为瓶数。

2 结果和分析

2.1 天麻素合成的薄层鉴定

薄层鉴定结果表明,转化后的人参毛状根样品在与天麻素标准品相对应的位置上有相同颜色的斑点,而空白对照却无此斑点,说明人参毛状根可以将对羟基苯甲醇转化为其本身不具有的天麻素。

2.2 毛状根不同培养阶段对天麻素合成的影响

用培养至不同阶段的人参毛状根转化浓度为 $1.000 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对羟基苯甲醇,结果见表1。当人参毛状根处于指数生长期时,天麻素含量和对羟基苯甲醇的转化率都处于较高水平,其中培养22 d 的人参毛状根中天麻素含量达最高值6.65%,对羟

表1 不同培养阶段对人参毛状根天麻素合成的影响
Table 1 Effects of different culture stages on gastrodin biosynthesis in the hairy root of *Panax ginseng* C. A. Mey.

培养时间/d Culture time	天麻素含量/% Content of gastrodin	转化率/% Transformation rate
16	4.96	30.5
19	5.78	60.6
22	6.65	84.8
25	4.50	61.3
28	4.37	63.4

基苯甲醇转化率也达到 84.8%。这是由于处于指数生长期的人参毛状根中葡萄糖基转移酶的活力较高的缘故。据此,选择培养 22 d 时的人参毛状根进行后续实验。

2.3 底物浓度对人参毛状根天麻素合成的影响

不同底物浓度对培养 22 d 的人参毛状根合成天麻素的影响结果见表 2。当对羟基苯甲醇浓度为 $1.000 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,所合成的天麻素含量最高,达 6.65%。随着对羟基苯甲醇浓度的增加,天麻素的含量和转化率均下降,故以后实验中的底物浓度都定为 $1.000 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 2 不同底物浓度对人参毛状根天麻素合成的影响¹⁾

Table 2 Effects of different concentrations of substrate on gastrodin biosynthesis in the hairy root of *Panax ginseng* C. A. Mey.¹⁾

底物浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Substrate concentration	天麻素含量/% Content of gastrodin	转化率/% Transformation rate
0.125	0.92	98.1
0.250	1.67	89.0
0.500	3.56	94.9
1.000	6.65	84.8
2.000	2.82	18.8

¹⁾ 底物为对羟基苯甲醇 The substrate is 4-hydroxybenzyl alcohol.

2.4 转化持续时间对天麻素合成的影响

不同转化时间对人参毛状根天麻素合成的影响见表 3。可以看出,转化 24 和 48 h,天麻素的含量分别达 6.65% 和 6.78%,对羟基苯甲醇转化率也分别达到 84.8% 和 90.4%,表明较长的转化时间有利于天麻素的合成,但由于对羟基苯甲醇易被氧化,易造成毛状根发黑等现象,因此,综合分析各项影响因素,以 24 h 为最佳的转化持续时间。

表 3 转化持续时间对人参毛状根天麻素合成的影响

Table 3 Effect of transformative lasting time on gastrodin biosynthesis in the hairy root of *Panax ginseng* C. A. Mey.

转化时间/h Transformative lasting time	天麻素含量/% Content of gastrodin	转化率/% Transformation rate
3	2.26	30.1
6	3.19	42.5
12	4.92	65.6
24	6.65	84.8
48	6.78	90.4

3 讨 论

尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)是葡萄糖的高能活

性形式,是合成葡萄糖苷的前体。植物培养物利用 UDPG 外源化合物糖基转移酶(E_1)糖基化外源化合物($R-OH$),得到相应的糖苷($R-OG$)和尿苷二磷酸(UDP)^[10]。人参毛状根将对羟基苯甲醇生物合成为天麻素,其生物合成途径见图 1。

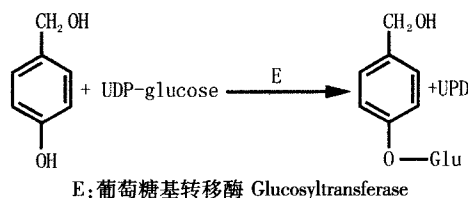


图 1 人参毛状根中天麻素的生物合成机理

Fig. 1 Mechanism of gastrodin biosynthesis in the hairy root of *Panax ginseng* C. A. Mey.

人参毛状根富含皂苷、多糖、维生素及微量元素等多种生物活性物质,与具有镇静、抗惊厥、抗炎、镇痛及增强机体免疫功能的天麻素配伍,具有更多的药用及开发利用价值。本文确定了影响人参毛状根合成天麻素的 3 个基本因素:培养阶段、转化持续时间和底物浓度,为工业化生产人参属植物所不能合成的天麻素等天然有用化合物奠定基础。天麻素合成过程中有许多影响因素,因而,如何提高人参毛状根的天麻素生物合成能力和规模有待深入研究。

参考文献:

- [1] 戴均贵, 果德安. 现代中药生物技术研究综述及展望[J]. 世界科学技术, 2000, 2(5): 27-30.
- [2] 戴均贵, 鲁丹丹, 崔亚君, 等. 桔梗悬浮培养对细胞天麻素的生物转化[J]. 药学学报, 2001, 36(12): 942-943.
- [3] 杨世林, 兰进, 徐锦堂. 天麻的研究进展[J]. 中草药, 2000, 31(1): 66-69.
- [4] 刘峻, 丁家宜, 徐红, 等. Ri 质粒人参转化系统的建立及鉴定[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(2): 95-98.
- [5] 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): 819-821.
- [6] 栗建明, 赵明强, 丁家宜. 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.
- [7] Zhan J X, Guo H Zh, Dai J G. Biotransformation of gastrodin by *Mucor spinosus*[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2001, 10(4): 187-189.
- [8] Dai J G, Gong Zh, Zhu D M, et al. Biotransformation of gastrodin by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(3): 377-378.
- [9] 赵明强, 丁家宜. 植物培养物对外源化合物的糖基化[J]. 药与实践杂志, 2000, 18(5): 340-342.

(责任编辑: 张垂胜)