

# 植物培养物对外源化合物的糖基化

赵明强, 一家宜(中国药科大学中药生物技术研究室, 南京 210038)

**摘要:**植物培养物能直接生产药品、香料、色素、农药、调料等有用物质。其体内存在羟基化酶、氧化酶、还原酶、甲基化酶、酯化酶、糖基转移酶、糖苷酶等多种酶。植物培养物能作为1种生物反应器转化外源化合物。生物转化是植物细胞工程的重要组成部分。本文就植物培养物糖基化外源化合物作1综述。目前研究主要集中于发现能糖基化外源化合物的植物培养物, 提取、分离、鉴定糖基化产物及优化糖基化条件等领域。

**关键词:**植物培养物 生物转化 糖基化 外源化合物

中图分类号: R28 文献标识码: A 文章编号: 1006- 0111(2000)05- 0340- 03

## 1 植物及其培养物糖基化内源、外源化合物的意义

植物及其培养物(悬浮培养细胞、固定化培养细胞、悬浮培养的根和 *Ri* 质粒转化的毛状根)在生长过程中会接触到如下几类化合物:(a)内源的次生代谢产物、(b)内源的植保素和生长激素、(c)外源的有机溶剂、杀虫剂、杀菌剂、生长激素等化合物。这些化合物在植物培养物以结合态和非结合态两种形式存在,这对于植物培养物生长发育和抵抗外界干扰具有重要意义。当植物培养物迅速生长或受到真菌侵染、虫咬、机械损伤等外界刺激时,上述化合物以非结合态发挥作用如促生长、杀菌、抗虫。但非结合态化合物在植物培养物细胞中过多存在,将干扰细胞内环境,妨碍植物培养物正常生长,甚至会导致植物培养物死亡。在植物培养物的自身调节机制作用下,化合物由非结合态转化为结合态。转化方式包括糖基化、甲基化、酯化。结合态化合物的生物活性低、稳定性强、运输和储藏方便,细胞毒性降低。所以植物培养物糖基化内源、外源化合物有利于其生长发育。

## 2 植物及其培养物糖基化外源化合物的机制

植物及其培养物体内富含尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)。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)。果糖苷、鼠李糖苷、洋地黄糖苷、阿拉伯糖苷的形成机制与葡萄糖苷的形成机制相似。



植物培养物糖基化外源化合物的反应可以分为两类:(a)直接糖基化,如含-NH<sub>2</sub>、OH、-COOH、-OCH<sub>3</sub>、-OCOCH<sub>3</sub>、-COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>等官能团的化合物被糖基化,这类反应较为常见。(b)间接糖基化,如1-8桉树脑,茴香酮,龙脑,石竹烯氧化物等不含上述官能团的化合物被糖基化。这类反应可能先由植物微粒体内的单加氧酶羟基化,再由糖基转移酶( $E_1$ )发挥作用。

## 3 植物培养物糖基化外源化合物的普遍性

各类培养体系的植物培养物都具有糖基化外源化合物的能力。悬浮培养细胞是最常见的糖基化反应器。例如桉树细胞(*Eucalyptus periniana*)能糖基化对氨基苯甲酸、丁香酚和异丁香酚、托品酸、甘草次酸、单萜类化合物。细胞发酵培养是悬浮培养的放大,不但能大规模合成次生代谢产物而且能大规模糖基化外源化合物,但由于植物细胞生长缓慢,转化率低,易污染,细胞发酵培养糖基化外源化合物成功的例子少(表1)。少量固定化培养细胞能糖基化大量外源化合物,转化率高。悬浮培养的人参(*Panax ginseng*)根合成皂苷的能力和糖基化外源化合物的能力都强于悬浮培养的愈伤组织。*Ri*质粒转化的毛状根一激素自养、生长迅速、遗传性状稳定、次生代谢产物合成能力强,可作为一种新型的糖基化反应器(表2)。

## 4 糖基转移酶

表1 发酵培养的植物细胞对外源化合物的糖基化

植物培养物	外源化合物	发酵罐体积
长春花( <i>Catharanthus roseus</i> )细胞	氢醌	20L
蛇根木( <i>Rauwolfia serpentina</i> )细胞	氢醌	1.5L
野梧桐( <i>Mallotus japonicus</i> )细胞	水杨酸	5L
桉树( <i>Eucalyptus periniana</i> )细胞	丁香酚、异丁香酚	10L
黄花蒿( <i>Artemisia annua</i> )细胞	蒿酸	5L
葡萄杂交( <i>Vitis hybrid</i> )细胞	槲皮素	3L
桉树( <i>Eucalyptus periniana</i> )细胞	卡哈苣昔元	10L

表2 悬浮培养的毛状根对外源化合物的糖基化

植物培养物	外源化合物
<i>Brugmansia candida</i> 毛状根	氢醌
山梗菜( <i>Lobelia sessilifolia</i> )毛状根	表儿茶素、原儿茶酸
人参( <i>Panax ginseng</i> )毛状根	洋地黄毒苷元
人参( <i>Panax ginseng</i> )毛状根	甘草次酸

糖基转移酶是植物培养物在糖基化外源化合物时产生的一种诱导酶。在体外,该酶只能以UDPG为供体糖基化外源化合物。Tanaka研究悬浮培养的野梧桐(*Mallotus japonicus*)细胞糖基化外源的邻、间、对羟基苯甲酸时

发现:对于不同的外源化合物和同一外源化合物上不同的基团如对羟基苯甲酸的 $-OH$ 、 $-COOH$ ,野梧桐细胞(*Mallotus japonicus*)都可能产生不同的糖基转移酶使之糖基化。*Bouhouche*发现悬浮培养的积雪草(*Centella asiatica*)细胞糖基化外源 3- demethylthiocolchicine 时产生的糖基转移酶粗提物的活性会被过量的 $Mn^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 抑制,但不被过量的 $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Mg^{2+}$ 抑制,且该粗提物具有较宽的底物范围,对于不同结构外源底物,糖基化率不同。*Joachim Arend*等通过悬浮培养的蛇根木(*Rauwolfia serpentina*)细胞糖基化外源氢醌,首次提纯了UDPG 氢醌葡萄糖基转移酶,发现其中 6 个肽段的氨基酸序列与其它植物的UDPG 次生代谢产物葡萄糖基转移酶的相应肽段的部分氨基酸序列相同,说明不同的糖基转移酶具有一定的同源性。

## 5 糖基化产物的特点

### 5.1 结构特点

苷键原子绝大多数是氧,目前只发现一例是氮。氧苷又包括酚苷、醇苷、酯苷。苷键的构型是 $\beta$ 构型。糖的种类有葡萄糖、葡萄糖衍生物、果糖、鼠李糖、洋地黄糖、阿拉伯糖。外源化合物上糖链的连接位置有一处、二处、三处。糖链上糖的个数从一个到多个。内端糖常以 1 位、4 位、6 位,极少数以 2 位与外源化合物相连。糖与糖之间以 1-6、1-4 连接为主,极少数以 1-2 连接。

### 5.2 糖基化产物的存在方式

糖基化产物的存在方式有两种:细胞内和培养液中。糖基化产物储藏在液泡中,细胞毒性降低。*Bouhouche*发现悬浮培养的积雪草(*Centella asiatica*)细胞糖基化 3- demethylthiocolchicine 后,其液泡变大了 1.5 倍。植物培养物的细胞内存在多酚氧化酶,可氧化糖基化产物,例如 *H. J. Scholten* 发现悬浮培养的毛茛罗细胞(*Datura innoxia*)糖基化外源氢醌得到的熊果苷不稳定,在培养基和细胞中存在时间都不超过 24 小时,可能被多酚氧化酶氧化。糖基化产物被分泌到培养基中,细胞毒性降低。*Masashi Ushiyama*发现外源化合物极性越小,糖基化产物越易被分泌到培养基中。

### 5.3 糖基化产物与植物培养物及其外植体的关系

糖基化产物与植物培养物及其外植体的关系有两种:(a)糖基化产物既不是植物培养物的,也不是其外植体的次生代谢产物,如悬浮培养的小果咖啡(*Coffea arabica*)细胞、桉树(*Eucalyptus periniana*)细胞糖基化甘草次酸得到甘草甜素。(b)糖基化产物不是植物培养物的,而是其外植体的次生代谢产物,如悬浮培养的甘草(*Glycyrrhiza labra*)细胞不能合成甘草甜素,却能糖基化甘草次酸得到甘草甜素,悬浮培养的羊角拗杂交(*Strophanthus hybrid*)细胞和其亲本细胞都不能合成强心苷,杂交细胞继承了亲本细胞的生物转化能力,既能象(*Strophanthus amboensia*)细胞一样使洋地黄毒苷元 3 位 $-OH$ 糖基化,

又能象旋花羊角拗(*Strophanthus gratus*)细胞一样使洋地黄毒苷元 17 位 $\beta$ 五元环异构化。

糖基化产物的结构可能受到植物培养物次生代谢的影响。如悬浮培养的人参(*Panax ginseng*)细胞糖基化洋地黄毒苷元、人参(*Panax ginseng*)根糖基化有机酸和酚类、人参(*Panax ginseng*)毛状根糖基化洋地黄毒苷元和甘草次酸的部分产物的糖链结构与人参皂苷的糖链结构有相似之处。

## 6 影响植物培养物糖基化外源化合物的因素

### 6.1 植物培养物的影响

植物培养物的种类、株系、生长阶段都将影响特定外源化合物的糖基化。*Bouhouche*发现悬浮培养的积雪草(*Centella asiatica*)细胞的生长阶段将影响糖基化产物的产量、含量、糖基化率,他认为悬浮培养细胞的对数生长期初期是糖基化外源化合物的最佳期。*Toshifumi Hirata*发现不同株系的悬浮培养烟草(*Nicotiana tabacum*)细胞的糖基化产物的构型不同,白色烟草(*Nicotiana tabacum*)细胞的糖基化产物全是 R 构型,绿色烟草(*Nicotiana tabacum*)细胞的糖基化产物全是 S 构型,原因可能是不同的培养条件产生了不同的酶系统。

### 6.2 外源化合物的影响

外源化合物的量,理化性质如极性、溶解性、稳定性、分子结构都会影响其被植物培养物糖基化。

外源化合物有细胞毒性,任何一种植物培养物所能糖基化外源化合物的量都有一个阈值,一旦超过,其生长将被抑制,甚至导致其死亡。悬浮培养的人参(*Panax ginseng*)根对极性越强的外源化合物,糖基化率越低,可能是外源化合物的极性越强,根的吸收率越低。洋地黄毒苷元、甘草次酸、鬼臼毒素等外源化合物溶解度小,难被植物培养物吸收,加入吐温-80、环糊精等助溶剂增加其溶解度,使其被吸收而糖基化。*Toshifumi Hirata*研究悬浮培养的白色烟草(*Nicotiana tabacum*)细胞糖基化羟基苯甲酸的三种异构体,发现只有伯醇基被糖基化,且酚羟基的取代位置会影响伯醇基的糖基化率,糖基化率是间位 $>$ 对位 $>$ 邻位。

### 6.3 培养条件

#### 6.3.1 培养基组成的影响

基本培养基的组成将影响外源化合物的糖基化。*Daniela A Casas*通过研究悬浮培养的(*Brugmasia Cardida*)的毛状根糖基化外源氢醌时不同碳源的影响,发现蔗糖做碳源时的糖基化率最高,并发现以蔗糖、葡萄糖为碳源时毛状根为浅褐色,以木糖醇、山梨糖醇为碳源时毛状根为黑色,他认为蔗糖、葡萄糖不但是UDPG的前体,而且能清除糖基化时产生的自由基,降低外源氢醌的细胞毒性。*Tsutomu Furuya*发现悬浮培养的桉树(*Eucalyptus periniana*)细胞在不含 $Fe^{2+}$ 的 $BA_1$ 培养基中对崖柏素的糖基化率是在含 $Fe^{2+}$ 的 $BA_1$ 培养基中的两倍。*Efrain*

lewinsohn 发现在改良 MT 培养基中 ( $[Fe^{2+}]$  降到 33 $\mu$ m) 悬浮培养的葡萄柚 (*Citrus paradisi*) 细胞能糖基化黄酮类化合物。

### 6.3.2 植物激素的影响

植物激素对植物培养物的生长、糖基化外源化合物能力有较大影响。常用的植物激素是控制生长的生长素和调节次生代谢产物合成的细胞分裂素。例如 Takashi Kometani 发现悬浮培养的小果咖啡 (*Coffea arabica*) 细胞糖基化外源辣椒碱, 加入 0.5 $\mu$ m<sup>2</sup>, 4-D 后细胞生长量和糖苷产量是加 5 $\mu$ mIAA 后的 2.7 倍, 加入 5 $\mu$ m<sup>2</sup>, 4-D 和 0.5 $\mu$ m Kinetin 后细胞生长量和糖苷产量是加入 5 $\mu$ mIAA 后的 3.8 倍。

### 6.3.3 其它影响因素

培养基起始 PH 值、光照、温度等因素对植物培养物生长、次生代谢产物的合成和糖基化外源化合物都有影响。

## 7 植物培养物糖基化外源化合物的应用前景

植物培养物糖基化外源化合物是植物培养物所特有的生物转化反应。它与化学反应合成糖苷相比, 有如下特点: (a) 前者是一步反应, 副产物少, 而后者包括乙酰化、糖基化、去乙酰化几步, 副产物多。(b) 前者具有空间特异性, 后者需要使用保护剂, 才能糖基化特殊的空间位点。但大多数植物培养物催化的糖基化反应的转化率低, 能够达到工业化生产的例子不多见。外源化合物被植物培养物糖基化后, 理化性质与生物活性发生较大改变, 能得到新的药品、调味品、化妆品。毛蔓陀罗 (*Datura innoxia*)、长春花 (*Catharanthus roseus*)、蛇根木 (*Rauwolfia*

*separatina*) 细胞转化氢醌为熊果苷, 产量分别达到 7.1g/L/3d, 9.2g/L/4d, 18g/L/7d。Van Uden 将鬼臼毒素转化为其葡萄糖苷, 转化率达到 294mg/L/d, 已达到化学合成的产量, 有望进行商业化生产。辣椒碱被糖基化后刺激性减小水溶性增强, 可以用做调料<sup>[50]</sup>。崖柏素被糖基化后水溶性, 稳定性增强, 可用做洗发液防腐剂。丁酸具有体外抑制肿瘤细胞生长和诱导肿瘤细胞分化的作用, 但体内半衰期太短, 通过悬浮培养的灰叶烟草 (*Nicotiana glauca*) 细胞糖基化得到其糖苷, 半衰期大大增加, 可开发为抗癌新药。通过糖基化洋地黄毒苷元, 可以得到功能更强, 副作用更小的强心苷。水杨酸糖基化为水杨酸氧苷后, 小鼠口服给药作用更快更强且长期给药不会诱导胃癌。大麻酚, 大麻二酚和大麻二醇酸的生理活性强, 但难以化学合成, 水溶性和稳定性差, 通过悬浮培养的非夏 (*Pinellia ternate*) 细胞使其糖基化, 可能得到药用价值更大的化合物。水飞蓟素具有保肝的作用, 尚未报道植物中存在其糖苷, 通过悬浮培养的罂粟 (*Papaver somniferum* var. *Setigerum*) 细胞得到的糖苷, 有望开发为新的保肝药<sup>[51]</sup>。通过悬浮培养的小果咖啡 (*Coffea arabica*) 细胞糖基化香草醛, 既能消除其怪味, 又不改变其抗菌、抗突变的作用, 使香草醛氧苷有可能成为新的调料和药品<sup>[57]</sup>。

利用植物培养物糖基化外源化合物的前景十分诱人, 有许多问题有待植物生物技术与药学工作者紧密结合, 共同开发利用, 为人类的保健事业作出更大的贡献。致谢: 本文得到刘峻老师的帮助, 特表谢意。

收稿日期: 2000-08-28

## 速热祛痛灵的研制及临床应用

陈 炎 (宁波市中医院药剂科, 宁波市 315010)

**摘要** 目的: 研制治疗腰背肌膜炎纯中药外敷制剂以避免口服中药对胃肠道的刺激作用。方法: 以川乌、川芎为主药的 12 味中药组成速效祛痛灵散剂, 并制定了其质量标准。结果与结论: 经临床观察验证, 使用速效祛痛灵治疗纤维肩周炎 321 例总有效率为 88.16%, 且复发率低。

**关键词:** 速热祛痛灵散剂; 质量标准; 纤维组织炎

中图分类号: R289.6 文献标识码: B 文章编号: 1006-0111(2000)05-0342-02

速热去痛灵作为热敷散剂是临床治疗腰背肌膜炎 (又称纤维组织炎) 的有效方剂。该方由降香等十二味中药组成, 系纯中药制剂。方剂中药物多为辛香走窜, 引经活络之品, 具有去寒止痛、活血通路、祛风除湿之功。临床适用于风寒湿痹、劳损扭闪、跌打损伤等诸多瘀滞作痛之症。专治各部位的软组织肌膜病痛。既可散在表之风, 又可化在里之湿。主治肩周炎、网球肘、坐骨神经痛、关节炎、颈椎病、痛经等。原方系外用中药洗剂, 为本院

骨伤科经验方, 虽疗效确切, 但携带、使用不便、浪费大、药效发挥不充分。经本院骨伤科中医叶海主任医师研制与上海华东理工大学协作改成热敷散剂。现将其制备、质量控制及临床使用情况介绍如下。

### 1 速热祛痛灵的制备方法

经过剂型改革之后的药物热敷散剂由药物与发热剂二部分组成。药物由、制川乌、川芎、冰片、桂枝、不茴香、石菖蒲、路路通、丁香、王不留行、姜黄、独活等组成。发