

104-112

植物毛状根的培养及其化学进展

2. 植物毛状根的次生代谢

周立刚* 王君健

(华中理工大学药物研究所 武汉 430074)

杨崇仁

(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

Q946-33

摘 要 本文介绍了毛状根的次生代谢调控、次生代谢物质的生产、生物转化、生物合成以及工业化应用。

关键词 毛状根, 次生代谢, 生物转化, 生物合成

0 前言

植物的次生代谢产物是天然药物、化妆品以及农药和工业原料的重要来源。从天然的植物资源提取和以化学合成的途径生产则存在资源、环保和成本问题。80年代以来,采用生物技术手段生产有用的植物次生代谢产物已日益成为人们关注的焦点。由于植物细胞培养是采用未分化的细胞,次生代谢产物的合成能力低且不稳定,而使产业化的进程受阻^[1]。用发根农杆菌转化植物细胞形成的毛状根(hairy root)能获得较稳定的培养系,生长速度快,有用成分含量高,为大量生产提供了有用的手段。植物毛状根的研究也促进了植物学科的基础理论(如农杆菌与植物细胞之间的相互作用、次生代谢调控、生物转化与生物合成、酶学、基因工程等)的研究。我们曾综述了植物毛状根的诱导形成与培养^[2],本文讨论植物毛状根的次生代谢及其应用。

1 毛状根的生长及其次生代谢调控

实验室建立的毛状根培养系具有生长快、生物合成能力强等特性,可以作为次生物质代谢研究的生理生化模型。对生物产量和次生代谢进行调控是毛状根规模化生产的重要基础。影响毛状根生长及其次生代谢产物形成的因素很多,而且常常是多因素综合作用,包括培养基的物理化学因子、营养条件、外源激素、光照、温度等环境因子。

1.1 常量元素的影响

在H培养基中,用1%水解酪蛋白替代硝酸铵,培养日本赛莨菪(*Scopolia japonica*)毛状根,可使莨菪胺含量增至3倍^[3]。培养基中加50 mmol/L的氮,白天仙子(*Hyoscyamus albus*)毛状根

收稿日期:1998-02-23

* 现在中国农业大学植物病理学系工作

在培养第 19 天后生长加快,但随着氮的增加,对毛状根的生长和生物碱的合成影响均不明显;而在 WP 培养基中,15 mmol/L 的氮可使毛状根中天仙子胺的含量达最高^[4]。B₅ 培养基中 5 mmol/L 磷对曼陀罗 (*Datura quercifera*) 毛状根中生物碱的合成有抑制作用,而 0.5 mmol/L 的磷对生物碱的合成有促进作用,此外,磷也影响到培养物的形态^[5]。MS 培养基中磷的含量对甜菜 (*Beta vulgaris*) 毛状根的色素形成影响很大,磷含量降低时有利于色素的形成^[6]。

1.2 微量元素的影响

当用 Fe-Na EDTA (浓度为 0.078 mmol/L) 代替 FeCl₃ 时,日本赛莨菪毛状根的生长速度剧增^[3]。Cu²⁺ 浓度为 0.5~1.0 μmol/L 时,对白天仙子毛状根的生长和生物碱的合成均有促进作用^[4]。

1.3 碳源的影响

碳源的种类和浓度对毛状根的生长和次生代谢产物的形成均有影响。5% 的蔗糖对曼陀罗毛状根的生长和生物碱的合成均有利,3%~5% 的蔗糖则仅对生长有利^[6]。果糖有利于长春花毛状根中 catharanthine 的合成,而蔗糖则有利于毛状根的生长^[7]。

1.4 pH 值的影响

pH 值的影响可能是通过影响酶和底物的解离状态而起作用。pH 值对孔雀草 (*Tugetes patula*) 的毛状根的生长和噻吩 (thiophene) 和积累均有影响^[8],pH 值为 4 时对氮的吸收有利,为 5.0 时对噻吩的合成有利,为 5.7 时却对生长有利。

1.5 光照的影响

光照对毛状根的生长和次生代谢物合成的影响比较明显,光照对孔雀草毛状根生长有抑制作用,而对噻吩类化合物的形成则有促进作用^[9]。

1.6 温度的影响

毛状根适宜生长的温度范围为 15~32℃,细胞的生长和次生代谢物形成的最适温度往往不同。温度在 25℃ 时有利于长春花毛状根的生长,而降低温度则有利于长春花毛状根中生物碱的积累,同时不饱和脂肪酸含量也相应增加^[10]。

1.7 激素或生长调节剂的影响

吲哚乙酸可促进人参毛状根中花色甙的形成,而 2,4-二氯苯氧乙酸则抑制色素的形成^[11]。毛喉鞘蕊花 (*Coleus forskohlii*) 的毛状根在无激素 B₅ 培养基中培养,二萜化合物以 forskolin 最高,当 B₅ 培养基附加 IBA 1 mg/L 和水解酪蛋白 600 mg/L 时,forskolin 的形成受到抑制,而其它两种二萜成分 (1,9-dideoxyforskolin 和 coleol) 的产率均得到提高^[12]。从粘团镰孢 (*Fusarium conglomerans*) 菌丝提取物中获得的真菌诱导子,能促进孔雀草毛状根中噻吩的形成^[13]。

2 毛状根中次生代谢产物

在一定条件下培养的植物毛状根新陈代谢活跃,次生代谢途径通常与原植物相似,不仅可以产生相同的化合物,也有可能积累中间产物和衍生物,从而为有用成分的生产提供基础,也为生物合成的研究提供了条件。从植物毛状根中分离到的化合物有生物碱、萜醌、单萜、倍半萜、二萜、蜕皮甾酮类、黄酮类等各种成分。表 1 仅列举首次从植物毛状根中分离到的化合物。

表 1 首次从植物毛状根中分离到的化合物
Table 1 The compounds first separated from plant hairy roots

毛状根名称 Name of hairy roots	化合物 Compound	参考文献 Document
膜荚黄芪 <i>Astragalus membranaceus</i>	agroastragaloside I	14
	agroastragaloside II	15
	agroastragaloside III	16
	agroastragaloside IV	16
长春花属 <i>Catharanthus trichophyllus</i>	anthraserpine	17
	dimethoxyanthraserpine	17
	pseudoanthraswepidine	17
	desanthraserpine	17
	dimethoxydesanthraserpine	17
白天仙子 <i>Hyoscyamus albus</i>	hyalbiidone	18
半边莲 <i>Lebelia inflata</i>	lobetyolin	19
	lobetyol	19
	lobetyolinin	20
黄芩 <i>Scutellaria baccatus</i>	5, 7, 2', 6'-tetrahydroxyflavone 2'-O- β -D-glucopyranoside	21
獐牙菜 <i>Suertia japonica</i>	8-O-primeverosyl-bellidifolin	22
	5-(3'-glucosyl)benzoyoxygenttistic acid	23
	2,6-dimethoxy-4-hydroxy-phenol-1-glucoside	23
菊蒿 <i>Tanacetum parthenum</i>	9-epipectachol B	24
缬草 <i>Valeriana officinalis</i> var. <i>sambucifolia</i>	valdiate	25

3 生物转化

生物转化是利用植物细胞的酶系统,使加入到反应系统中的有机底物结构发生改变的生理生化过程^[26]。近年来,用毛状根培养物进行生物转化的例子逐渐增多,这主要是由于毛状根的诱导和培养技术日益成熟,加之一些次生代谢酶系统的活化程度常常与分化有关。表 3 列举了利用毛状根进行生物转化的例子。利用人参毛状根进行毛地黄毒甙基(digitoxigenin)^[27]和 18 β -甘草亭酸(18 β -glycyrrhetic acid)^[30]的生物转化,转化产物如图 1 和图 2 所示。

4 生物合成

由于某些次生代谢与根的形态分化有关,其代谢过程中的酶系统处于较高的活性,从而使毛状根成为研究某些次生代谢物生物合成的理想材料,近年来这方面的例子在不断增加(见表 3)。如 Robins 等用(RS)-phenyl-[1,3-¹³C₂]-lactic acid 饲喂曼陀罗毛状根^[13],生成一系列含标记的化合物如:apoatropine, littorine, aposcopolamine, 莨菪碱(hyoscyamine), 7 β -hydroxyapoatropine, 东莨菪碱(scopolamine), 7 β -羟基莨菪碱 7 β -hydroxyhyoscyamine),从而否认了以前认为莨菪酸(tropic acid)是莨菪烷生物碱生物合成唯一的直接前体,生物合成途径如图 3 所示。

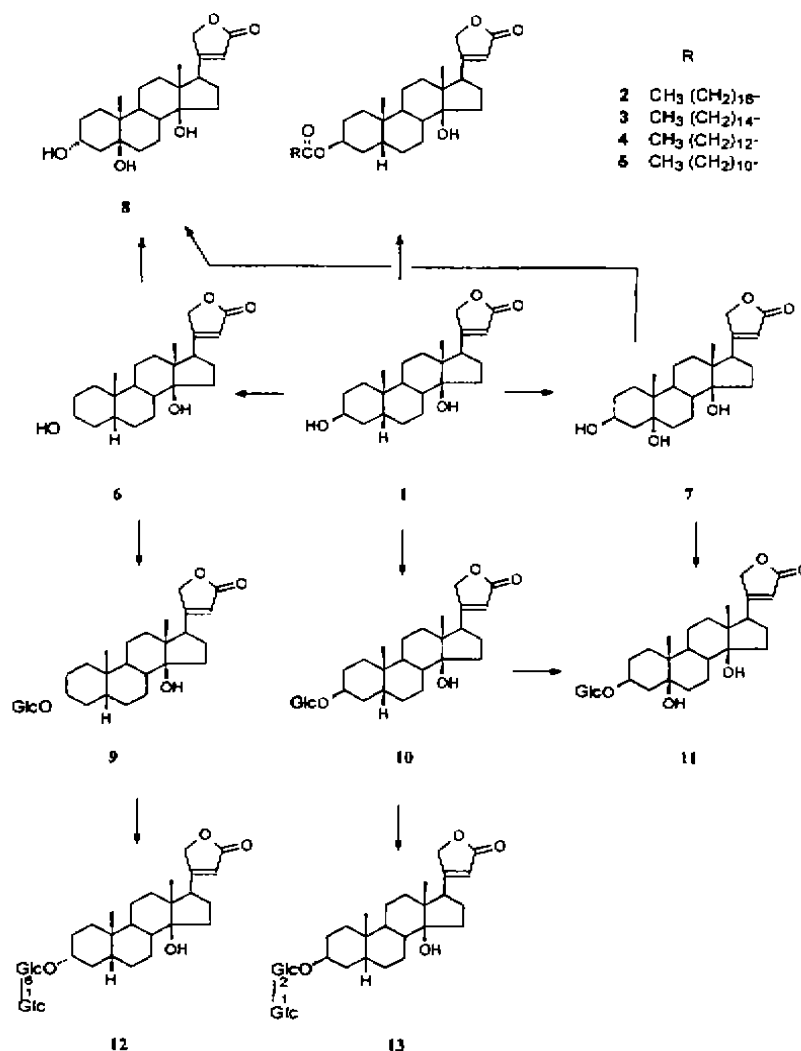


图 1 利用人参毛状根进行毛地黄毒甙配基的生物转化^[27]

Fig. 1 Biotransformation of digitoxigenin by *Panax ginseng* hairy roots

1. digitoxigenin; 2. digitoxigenin stearate; 3. digitoxigenin palmitate; 4. digitoxigenin myristate; 5. digitoxigenin laurate; 6. 3-epidigitoxigenin; 7. periptogenin; 8. 3-epiperiptogenin; 9. 3-epidigitoxigenin β -D-glucoside; 10. digitoxigenin β -D-glucoside; 11. periptogenin β -D-glucoside; 12. 3-epidigitoxigenin β -D-gentiobioside; 13. digitoxigenin β -D-sophoroside

5 次生代谢物的工业化生产

利用未分化的培养细胞生产次生代谢产物方兴未艾,而毛状根培养物应用于商业生产也许会有更多的机会。开发大容量的生物反应器对毛状根培养进行自动化调控是关键的一步。目前,达到工业化规模培养毛状根的例子还很少,人参毛状根的培养规模已达 2 000 L^[42]。

由于毛状根的抗切变能力仍较低,不适宜强烈的搅拌,因此设计出合适的培养装置显得十分困难。Rhodes 等(1986)利用空气搅拌反应器,毛状根的生物量可达 30 g 干重/L^[43]。利用生

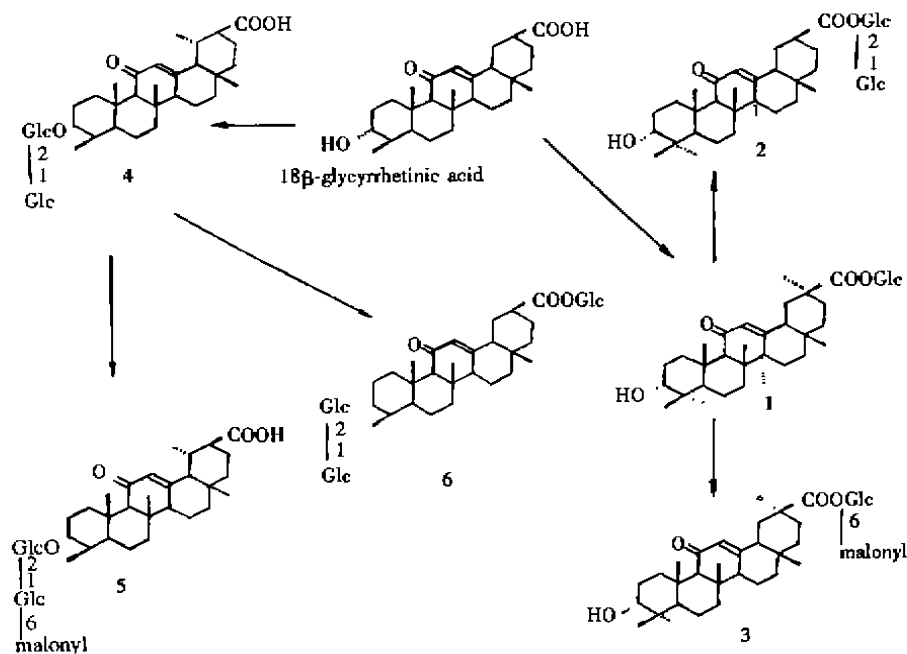


图 2 利用人参毛状根进行 18β-甘草亭酸的生物转化^[30]

Fig. 2 Biotransformation of 18β-glycyrrhetic acid by *Panax ginseng* hairy roots

1. 30-O-(β-D-glucopyranosyl) 18β-glycyrrhetic acid; 2. 30-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl] 18β-glycyrrhetic acid; 3. 30-O-(6-O-malonyl-β-D-glucopyranosyl) 18β-glycyrrhetic acid; 4. 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl] 18β-glycyrrhetic acid; 5. 3-O-[6-O-malonyl-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl] 18β-glycyrrhetic acid; 6. 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl] 30-O-(β-D-glucopyranosyl) 18β-glycyrrhetic acid

表 2 用植物毛状根进行有用成分的生物转化

Table 2 Biotransformation of useful components by plant hairy roots

毛状根名称 Name of hairy roots	底物 Substrate	产物 Product	反应类型 Reaction type	参考文献 Document
人参 <i>Panax ginseng</i>	digitoxigenin	digitoxigenin laurate	酯化 Esterification	27
		digitoxigenin myristate	酯化 Esterification	27
		digitoxigenin palmitate	酯化 Esterification	27
		digitoxigenin stearate	酯化 Esterification	27
		digitoxigenin β-D-glucoside	配糖化 Glycosylation	27
		digitoxigenin β-D-spheroside	配糖化 Glycosylation	27
		digitoxigenin β-D-glucoside	配糖化 Glycosylation	27
人参 <i>Panax ginseng</i>	(RS)-2-phenyl-propionic acid	(RS)-2-phenylpropionic-β-D-glucoside	酯化 Esterification	28
	2-(3-benzoylphenyl)-propionic acid	2-(3-benzoylphenyl)-propionyl-glucoside	酯化 Esterification	28
鬼针草 <i>Bidens sulphureus</i>	butylated hydroxytoluene	ditmeric stibenequinone	氧化 Oxidation	29

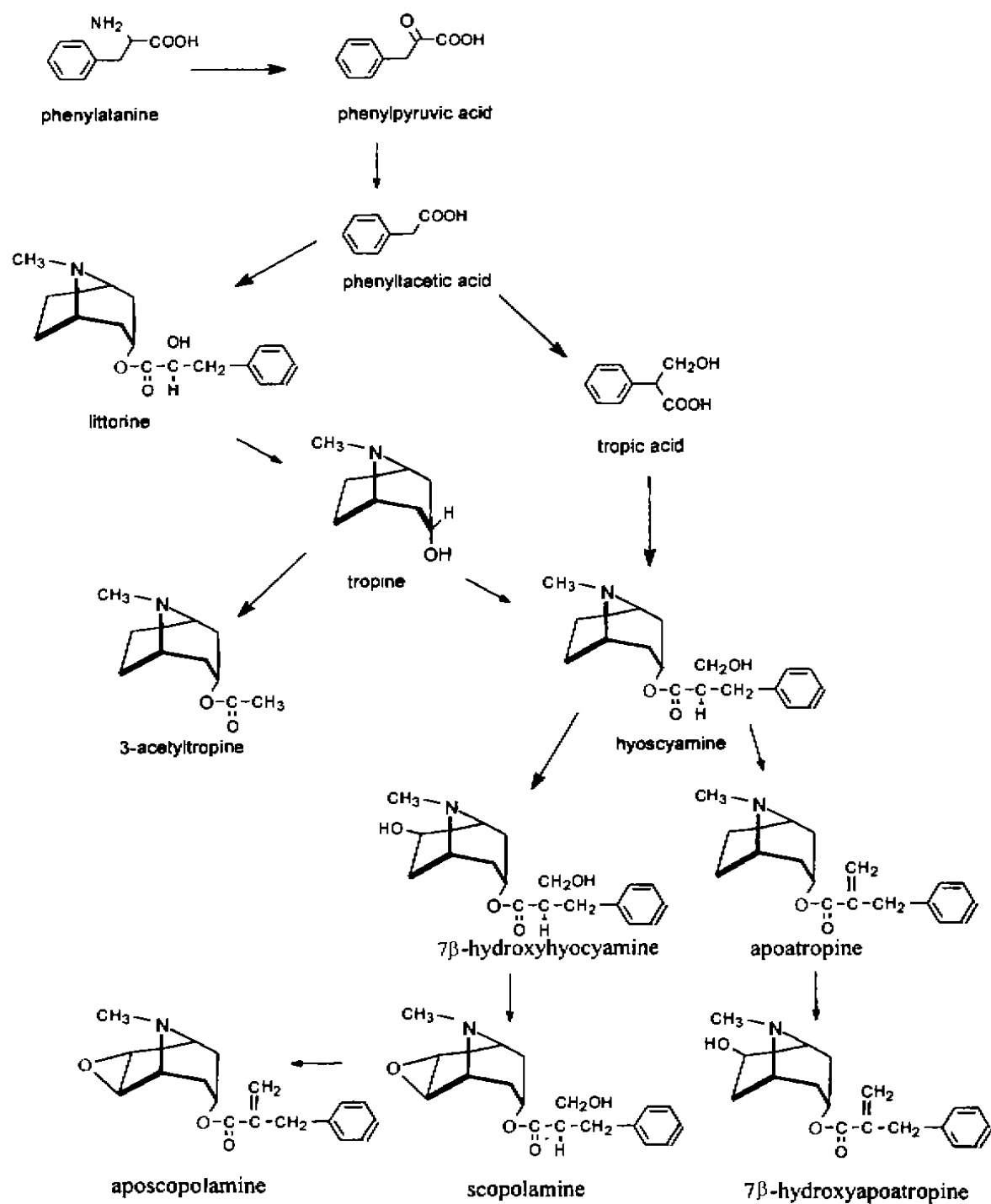
图3 利用曼陀罗毛状根进行莨菪烷生物碱的生物合成^[31]Fig. 3 Biosynthesis pathway of tropane alkaloids by *Datura stramonium* hairy roots

表 3 用植物毛状根进行次生代谢物的生物合成的例子
Table 3 Biosynthesis of secondary metabolites by plant hairy roots

毛状根名称 Name of hairy roots	标记前体 Labeled precursor	生物合成途径 的化合物类别 Compound type of biosynthetic pathway	参考文献 Document
筋骨草 <i>Ajuga reptans</i> var. <i>atropurpurea</i>	[2- ¹³ C]acetate, [26, 27- ¹³ C ₂]cholesterol	蜕皮甾酮化合物	32
筋骨草 <i>Ajuga reptans</i> var. <i>atropurpurea</i>	[26, 27- ¹³ C ₂]desmosterol	cholesterol 和 codisterol	33
豚草 <i>Ambrosia artemisiifolia</i>	[1- ¹³ C]-, [2- ¹³ C]-, [1, 2- ¹³ C ₂]-acetate	thiarubrine A	34
木曼陀罗杂交种 <i>Brugmansia candida</i> × <i>B. aurea</i>	L-[2'- ¹³ C]phenylalanine, L-[3'- ¹³ C]phenylalanine, DL-[2- ¹³ C]valine	莨菪烷生物碱	31
两色金鸡菊 <i>Coreopsis tinctoria</i>	L-[2'- ¹³ C]phenylalanine, L-[3'- ¹³ C]phenylalanine, DL-[2- ¹³ C]valine	1'-isobutyryloxyeuge-nol-4- isobutyrate	35
曼陀罗 <i>Datura stramonium</i>	L-[2'- ¹³ C]phenylalanine, L-[3'- ¹³ C]phenylalanine, DL-[2- ¹³ C]valine	莨菪烷生物碱	31
天仙子 <i>Hyoscyamus albus</i>	CH ₃ - ¹³ CCOONa	莨菪烷生物碱	36
莴苣 <i>Lactuca floridana</i>	[1- ¹³ C]-, [2- ¹³ C]-, [1, 2- ¹³ C ₂]-acetate; [2- ¹³ C ₂]mevalolactone	lactucin 衍生物 lactucin derivatives	37
烟草属 <i>Nicotiana hesperis</i>	L-[¹⁴ C]-lysine	anabasine	38
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	(R)-and (S)-1, 5- diaminopentane	[1- ³ H]-anabasine	39
骆驼蓬 <i>Peganum harmala</i>	tryptophan-3-[¹³ C]	serotonin 和 β-carboline alkaloids	40
麻花头属 <i>Serratula tinctoria</i>	胆固醇 cholesterol	蜕皮甾酮化合物	41

物反应器连续培养毛状根必须满足:(1)产物至少部分从毛状根中释放出来;(2)毛状根在高密度的填充床中培养而不丧失生长能力;(3)生长和合成可以同时进行。

6 结束语

目前,利用组织培养物生产次生代谢物还处于发展阶段,和未分化的细胞培养物相比,毛状根的应用优势是明显的,它不仅具有生长速度快、合成能力强、遗传稳定性好等优点,而且适

合于筛选和基因操作,使得离体培养物在有用化学物质合成中的作用得到根本的变化。有关毛状根的诱导和培养还有不少问题有待人们不断摸索,加以克服,目前需要解决的问题至少包括以下几个方面:(1)需要进一步弄清毛状根的诱导机制,摸索促进单子叶植物和发根农杆菌结合的条件,以提高单子叶植物毛状根的诱导率;(2)进一步摸索毛状根的培养条件及其次生代谢规律,为生物转化、生物合成以及大规模生产创造条件;(3)摸索一套合适的培养工艺,尽快将毛状根的大量培养投入应用。

参考文献

- 1 Saito K *et al.* *J. Nat. Prod.* ,1992,55:149~162
- 2 周立刚等.天然产物研究与开发,1998,10(3):87~95
- 3 Mano Y *et al.* *Agric. Biol. Chem.* ,1986,50:2715~2722
- 4 Christen P *et al.* *Plant Cell Reports*,1992,11:597~600
- 5 Payne J *et al.* *Planta Med.* ,1987,53:474~478
- 6 Taya M *et al.* *J. of Ferment. and Bioeng.* ,1994,77:215~217
- 7 Jung KH *et al.* *Biotechnol. Lett.* ,1992,14:695~700
- 8 Mukundan U and Martin A. *Plant Cell Reports*,1991,9:627~630
- 9 Mukundan U and Hijortso MA, *J. Plant Physiol.* ,1991,139:252~255
- 10 Toivonen L *et al.* *Plant Cell Reports*,1992,11:395~399
- 11 Ko KM *et al.* *J. Plant Biology*,1993,37:85~91
- 12 周立刚等.云南植物研究,1996,18:445~450
- 13 Mukundan U *et al.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* ,1990,33:145~147
- 14 Hirotani M *et al.* *Phytochemistry*,1994,36:665~670
- 15 Hirotani M *et al.* *Phytochemistry*,1994,37:1403~1407
- 16 Zhou Y *et al.* *Phytochemistry*,1995,38:1407~1410
- 17 Davioud E *et al.* *Phytochemistry*,1989,28:1383~1388
- 18 Sauerwein M *et al.* *Phytochemistry*,1991,30:2977~2978
- 19 Ishimaru K *et al.* *Phytochemistry*,1991,30:2255~2258
- 20 Ishimaru K *et al.* *Phytochemistry*,1992,31:1577~1579
- 21 Zhou Y *et al.* *Phytochemistry*,1997,44:83~87
- 22 Ishimaru K *et al.* *Phytochemistry*,1990,29:1563~1565
- 23 Ishimaru K *et al.* *Phytochemistry*,1990,29:3823~3825
- 24 Kieiel W and Stojakowska A, *Phytochemistry*,1997,46:515~516
- 25 Granicher F *et al.* *Phytochemistry*,1995,38:103~105
- 26 Pras N, *Journal of Biotechnology*,1992,26:29~62
- 27 Kawaguchi K *et al.* *Phytochemistry*,1990,29:837~843
- 28 Furuya T *et al.* *Phytochemistry*,1989,28:483
- 29 Flores HE *et al.* *Plant Physiology and Biochemistry*,1994,32:511~519
- 30 Asada Y *et al.* *Phytochemistry*,1993,34:1049~1052
- 31 Robins RT *et al.* *Planta*,1994,194:86~94
- 32 Nagakari M *et al.* *Phytochemistry*,1994,36:907~910
- 33 Yagi T *et al.* *Phytochemistry*,1996,41:1057~1064
- 34 Gomez-barrios ML *et al.* *Phytochemistry*,1992,31:2703~2707
- 35 Horz KH and Reichling J, *Phytochemistry*,1993,33:349~351
- 36 Sauerwein M *et al.* *Phytochemistry*,1993,32:905~909

- 37 Song Q *et al.* *Phytochemistry*, 1995, 40: 1659~1665
- 38 Walton N and Belshaw NJ, *Plant Cell Rep.*, 1988, 7: 115~118
- 39 Watson AB *et al.* *Planta Medica*, 1990, 56: 602~603
- 40 Berlin J *et al.* *Phytochemistry*, 1993, 33: 593~597
- 41 Delbecque JP *et al.* *Eur. J. Entomol.*, 1995, 92: 301~307
- 42 张 林. 植物学通报. 1991, 8: 30~33
- 43 Rhodes MJC *et al.* *Biotech. Lett.*, 1986, 8: 415~420

PROGRESS ON PLANT HAIRY ROOT CULTURE AND ITS CHEMISTRY

2. SECONDARY METABOLISM OF PLANT HAIRY ROOTS

Zhou Ligang, Wang Junjian

(Institute of Materia Medica, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

Yang Chongren

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

Abstract This review outlines the progress of secondary metabolism of plant hairy roots including hairy root growth, secondary metabolic regulation, production of secondary metabolites, biotransformation, biosynthesis, and industrial application.

Key words hairy roots, secondary metabolism, biotransformation, biosynthesis

广告、征稿、征订启事索引

- DELTA天然有机化合物信息中心(5)
- 《中国药理学报》征订启事(10)
- 征购天然产物纯品、医药中间体(16)
- 国家天然药物工程技术研究中心在中科院成都地奥制药公司挂牌运行(22)
- 1999年《中文科技资料目录·中草药》征订启事(26)
- 《应用与环境生物学报》1999年改为双月刊(32)
- 欢迎订阅1999年《林业科学研究》(36)
- 欢迎订阅《生物化学与生物物理进展》(40)
- 中国科学院新药开发基金管理委员会启事(52)
- 《华西药学杂志》1999年征订启事(57)
- 欢迎订阅《精细化工》(66)
- 欢迎订阅1999年《武汉植物学研究》(71)
- 《天然产物研究与开发》杂志社广告管理实施办法(76)
- 《中国生物学文献数据库》光盘及《中国生物学文献》征订启事(95)