

桔梗悬浮培养对细胞天麻素的生物转化

戴均贵, 鲁丹丹, 崔亚君, 郭洪祝, 郑俊华, 果德安*

(北京大学药学院, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

关键词: 桔梗; 天麻素; 生物转化; 悬浮培养细胞

中图分类号: Q813.12

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2001)12 - 0942 - 02

天麻素即对羟基甲基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷(4-hydroxymethylphenyl- β -D-glucopyranoside), 为兰科植物天麻(*Gastrodia elata* Bl.) 的主要活性成分^[1], 有镇静、抗惊厥、抗炎、镇痛及增强机体免疫功能等作用。用植物细胞悬浮培养物对外源底物进行生物转化从而对其结构进行修饰, 以获得更有意义的产物的报道^[2,3]很多, 也是当今研究的热点。生物转化(biotransformation), 也称生物催化(biocatalysis), 是利用植物离体培养细胞或器官、动物、微生物及细胞器等对外源化合物进行结构修饰而获得有价值产物的生理生化反应, 其本质是利用生物体系本身所产生的酶对外源化合物进行酶催化反应, 它具有反应选择性强(位置选择性和立体选择性)、反应条件温和、副产物少、不造成环境污染和后处理简单等优点, 并且可以进行传统有机合成所不能或很难进行的化学反应。生物转化正是具有这些特点而逐渐被各国科学家所重视, 有着较大的理论及实际应用价值。本文进行了桔梗愈伤组织的诱导、培养, 建立了桔梗悬浮细胞培养体系, 并利用桔梗悬浮培养细胞对天麻素进行生物转化研究。

材料与方 法

材料及无菌苗的获得 试验材料为桔梗(*Platycodon grandiflorum* (Jacq) A. DC.) 的幼苗, 采自北京大学药学院苗圃, 由北京大学药学院果德安教授鉴定。剪其嫩茎洗净后用 70% 酒精浸泡 30 s 后放入 0.1% HgCl_2 中灭菌 15 min, 以无菌水冲洗 3 - 5

次, 取出剪成约 1 cm 带节小段, 接种于 $\text{MS} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 培养基中进行无菌苗诱导, 约 1 周后, 腋芽开始启动, 3 - 4 周后长成约 5 - 10 cm 无菌苗。

桔梗愈伤组织的诱导和悬浮细胞培养体系的建立 剪取桔梗无菌苗的叶片和茎段, (茎段剪成约 1 cm 的小段, 叶片剪成约 0.5 cm \times 0.5 cm 的小块), 于培养基中诱导愈伤组织的形成。将继代若干次, 生长较好的愈伤组织转入液体培养基中培养, 开始 3 代每 10 d 转接 1 次, 约第 4 - 5 代后细胞便能在液体培养基中稳定生长。

培养条件 培养温度均为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 黑暗培养, 细胞悬浮培养时摇床转速约为 $110 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

桔梗悬浮细胞对天麻素的生物转化 底物天麻素用量为 250 mg, 无水乙醇溶解, 浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。待桔梗细胞生长到 15 d 时, 用微量移液器吸取一定量加入三角瓶中, 使底物的加入浓度为 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。8 d 后抽滤回收培养液, 并用蒸馏水将培养物清洗 3 次, 合并滤液, 用等量乙酸乙酯萃取 5 次, 蒸干, 残渣用丙酮溶解后滤去不溶物进行硅胶(200 - 300 目, 青岛海洋化工厂) 柱色谱分离。洗脱剂为氯仿-甲醇(19:1)。合并含有产物的流份, 减压浓缩溶剂, 丙酮-石油醚中结晶后, 进行波谱分析。

结 果 与 讨 论

1 桔梗茎段和叶片愈伤组织的诱导与培养

试验了 6-BA、2,4-D、NAA 3 种不同种类的激素及其不同的浓度, 结果表明 $\text{MS} + 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 适宜桔梗愈伤组织的诱导, 为进一步研究适于其生长的条件, 进行了以下试验: 将在 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 中诱导的愈伤化外植体转入混合激素 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 和 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 中分别进行继代培养, 结果发现在混合

收稿日期: 2001-04-29.

基金项目: 国家杰出青年基金(39925040); 教育部跨世纪优秀人才基金资助项目.

作者简介: 戴均贵(1969 -), 男, 博士后;

果德安(1962 -), 男, 教授, 博士生导师.

* 通讯作者 Tel: (010) 62091516, Fax: (010) 62092700,

E-mail: gda@mail.bjmu.edu.cn

激素 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 中培养的愈伤组织虽有生长,但同时也有根和芽的发生,而在 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 中培养的愈伤组织生长迅速,无根芽分化。因此对愈伤组织的生长来说, $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 优于混合激素 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, 生长周期只需约 2 周左右。

2 桔梗细胞悬浮培养

将生长较旺盛的桔梗愈伤组织接种于 MS + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 液体培养基中进行培养,开始的几代细胞分散得不均匀,有大的细胞团块,经过 4 - 5 代后,细胞团分散比较均匀,生长速度加快。另外在培养过程中观察到悬浮培养的细胞有两种状态(细胞系 JX-1 和细胞系 JX-2): JX-1 细胞系表现为细胞团较小,呈淡黄色,生长速度较快;而 JX-2 细胞系细胞团较大,呈微紫红色,生长速度较慢。将 JX-1 细胞系用于天麻素的生物转化研究。

3 桔梗悬浮细胞对天麻素的生物转化及其产物结构的鉴定

3 次预试验通过 TLC 检查均发现桔梗悬浮细胞对天麻素进行了转化,然后进行制备生物转化试验。培养液乙酸乙酯提取物经硅胶柱色谱进行分离,所得到的 1 个转化产物为无色羽状结晶(丙酮-石油醚)。 $^1\text{H NMR}$ (CD_3COCD_3) δ : 3.99(1H, t, $J = 5.7 \text{ Hz}$, 羟甲基氢), 4.50(2H, d, $J = 5.4 \text{ Hz}$, CH_2), 6.77(2H,

dd, $J = 1.8, 6.3 \text{ Hz}$, 苯环氢), 7.16(2H, d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 苯环氢), 8.20(1H, s, 酚羟基氢); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3COCD_3) δ : 64.51(1C, 羟甲基碳), 115.70(2C, 苯环碳), 129.03(2C, 苯环碳), 134.16(1C, 苯环碳), 157.26(1C, 苯环碳); EF MS (m/z): 124(M^+), 107($\text{M} - \text{OH}$), 95, 77, 65, 51, 39。综上波谱数据可确定所得转化产物为对羟基苯甲醇,为天麻素脱去葡萄糖残基的产物,其反应如图 1 所示。

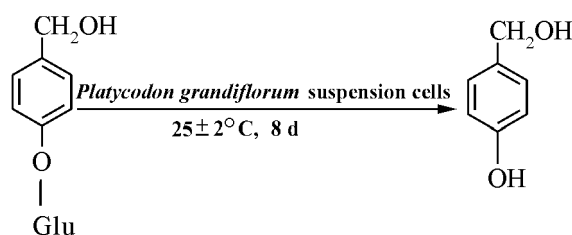


Figure 1 Biotransformation of gastrodin by cultured cells of *Platycodon grandiflorum* in suspension

REFERENCES:

- [1] Yang SL, Lan J, Xu JT. Progress of study on *Gastrodia elata* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (in Chinese), 2000, **31**(1): 66 - 69.
- [2] Furuya T, Asada Y, Mizobata S, et al. Biotransformation of *p*-aminobenzoic acid by cultured cells of *Eucalyptus perniiana* [J]. *Phytochemistry*, 1998, **49**(1): 109 - 111.
- [3] Vanek T, Valterova I, Vaisart T. Biotransformation of (*S*)-(-)- and (*R*)-(+)-limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* plant cells [J]. *Phytochemistry*, 1999, **50**(8): 1347 - 1351.

BIOTRANSFORMATION OF GASTRODIN BY CELL SUSPENSION CULTURE OF *PLATYCODON GRANDIFLORUM*

DAI Jun-gui, LU Dan-dan, CUI Ya-jun, GUO Hong-zhu, ZHENG Jun-hua, GUO De-an

(The State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT: AIM To modify the structure of gastrodin using cell suspension cultures of *Platycodon grandiflorum* as biocatalyst. **METHODS** Using plant tissue and cell culture techniques to establish cell suspension cultures, and chromatographic and spectral techniques to isolate and identify the product. **RESULTS** 1) The medium of MS + $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA was good for the induction and growth of the callus cultures, and that of MS + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D for the growth of suspended cell cultures. 2) Gastrodin was bioconverted to *p*-hydroxy-methyl-phenol, the deglycosyl derivative, in good yield by cell suspension cultures of *Platycodon grandiflorum*. **CONCLUSION** Biotransformation using plant cell suspension cultures is an approach to structural modification of some natural products.

KEY WORDS: gastrodin; *Platycodon grandiflorum*; biotransformation; cell suspension cultures