

## 茜草组织培养生产蒽醌的研究进展

曹高山, 魏泉增, 薛建平

(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 对茜草中蒽醌合成途径以及通过茜草组织培养生产蒽醌的研究进展进行了简要的综述, 介绍了在茜草的组织培养中影响细胞生长、次生代谢产物的因素以及提高蒽醌产量的措施。

**关键词:** 茜草; 蒽醌; 组织培养

**中图分类号:** TQ244.6    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0254-5071(2008)13-0005-04

Research progress on anthraquinone production by tissue culture of *Rubia cordifolia*

CAO Gaoshan, WEI Quanzeng, XUE Jianping

(College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The biosynthetic pathways of anthraquinones in *Rubia cordifolia* and the research achievements of anthraquinone produced by tissue culture of *Rubia cordifolia* were reviewed in this article. Several environmental factors which influence the cell growth and the formation of secondary metabolites, and some measures used to enhance anthraquinone's yield were introduced.

**Key words:** *Rubia cordifolia*; anthraquinones; tissue culture

茜草 (*Rubia cordifolia*) 又称小活血、红根草, 始载于《神农本草经》, 药典(1995年版)记载: 茜草为茜草科植物, 具有凉血、止血、祛瘀、通经之功。在日本, 茜草不仅是天然染料, 而且是传统的凝血药物。1982年日本系川秀治从中国上海的茜草及日本产的刺茜草的甲醇提取物中分离得到12个抗癌作用的环己肽单体。冯松杰等<sup>[1]</sup>报道茜草双酯具有促进实验动物骨髓造血细胞增殖和分化的作用。茜草中的蒽醌及其二聚体在体内外均能明显抑制肺癌 V-79, KB、白血病 P388 细胞株, 体内抑制 S180A 癌细胞株<sup>[2]</sup>。陈寅生等<sup>[3]</sup>分离到茜草中的多糖 NP 和 AP, 两者均具有抗辐射活性, 抗辐射效价优于茜草片组。尹江宁等<sup>[4]</sup>发现茜草多糖还有抗氧化、清除自由基、抗衰老的作用。另外, 康文艺等<sup>[5]</sup>研究报道从茜草中分离到了具有抗氧化活性的成分茜草素(Alizarin)。与欧茜草相比, 中国茜草中不含有毒成分卢西丁<sup>[6]</sup>, 使得中国茜草在世界上的需求量激增。

茜草是多年生草本植物, 繁殖系数低, 加上我国人口多、耕地少, 占用大量耕地栽培药材已不合时宜, 需另辟途径。植物组织培养是在植物细胞理论上发展起来的一项高端生物技术, 与传统栽培方式相比, 组织培养方法简便易行、不受时间地域和材料生长时期的限制, 短时间内可获得纯系的大量植物培养物, 采用组培方法有望成为一种

有效的植物有效成分生产途径。由于茜草中的主要药用成分为蒽醌, 本文结合国内外研究进展, 对茜草中蒽醌的生物合成途径及通过茜草组织培养生产蒽醌进行了综述。

## 1 蒽醌及其生物合成途径

蒽醌类(Anthraquinones)化合物是一类广泛存在于自然界的重要天然色素, 在高等植物、低等植物的真菌、地衣中都有分布。蒽醌类主要包括蒽醌及其二聚体、蒽酚、氧化蒽酚、蒽酮及蒽酮的二聚体等, 其中蒽醌又可分为大黄素型和茜草素型。大黄素型蒽醌主要分布于巴戟天、虎杖、大黄等, 其分子中羟基分布在蒽醌中苯环两侧。茜草素型蒽醌主要分布于茜草中, 其分子中羟基分布在蒽醌分子一侧的苯环上。中药茜草中含有19种蒽醌类化合物, 主要有茜草素(alizarin)、羟基茜草素(purpurin)等<sup>[7]</sup>。

HAN Y S 等<sup>[8]</sup>较全面、科学地研究报道了蒽醌的生物合成途径(见图1)。在高等植物中, 蒽醌的生物合成主要有2种途径: 聚酮途径和分支酸/琥珀酰苯甲酸途径。茜草科植物中蒽醌类的合成主要通过后一种途径, 经由莽草酸、异分支酸和 $\alpha$ -酮戊二酸, 再经一系列代谢分别形成茜草素型蒽醌的A环和B环, C环来自异戊烯基二磷酸(isopentenyl diphosphate IPP), 过去认为异戊烯基二磷酸通过甲羟戊酸途径或甲基赤藓醇磷酸(MEP)途径

收稿日期: 2008-03-18

作者简介: 曹高山(1979-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事发酵工程方面的研究工作。

Appl Environ Microb, 1981, 41: 746-751.

[20] 耿予欢, 李国基, 张本山. 豆酱中白色物质的分析研究[J]. 中国酿造, 2005(2): 12-14.

[21] 李国基, 唐伟强, 汪海洪. 蒜蓉豆豉酱白点结晶问题的研究[J]. 食品

与发酵工业, 1997, 23(1): 32-34.

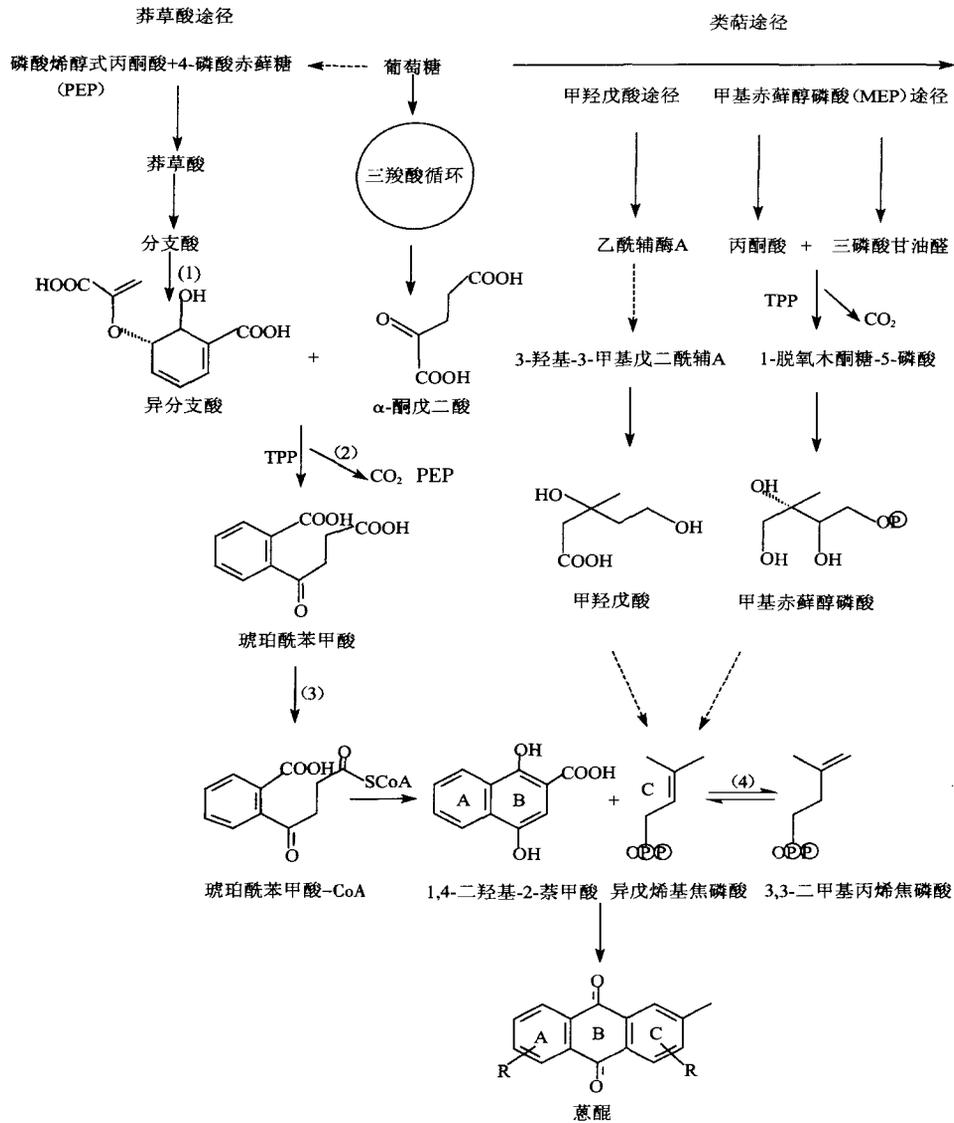
[22] CHIOU R Y-Y, FERNG S, CHEN M-J. White particulate formation as a result of enzymatic proteolysis of protein substrates in brine-fermented foods [J]. Lebensm Wissu Technol, 1997, 30: 241-245.

(2-C-methyl- D-erythritol 4-phosphate pathway)形成。HAN Y S等研究发现茜草植物中 IPP 是通过 MEP 途径形成的,但有关许多茜草合成的具体步骤还不太清楚。

2 茜草组织培养生产蒽醌

早在 20 世纪 80 年代日本就有学者做过茜草的组织培养, SUZUKI H 等<sup>[9]</sup>从茜草的细胞培养物中分离出 4 种自由蒽醌:亮黄素-乙基醚(lucidin-ethylether)、伪羟基茜

草素(pseudopurpurin)、茜草素(alizarin)、羟基茜草素(purpurin)。并分离出 1 种蒽醌苷(ruberythric acid)。近年来, MISCHENKO N P 等<sup>[10]</sup>研究了茜草愈伤组织的培养及高产细胞系的建立,用采自俄罗斯的一种茜草,诱导出了愈伤组织,研究指出茜草愈伤主要产生羟基茜草素(purpurin)和 munjistin 2 种蒽醌,占总产生蒽醌的 90%,并介绍了简单、科学地测定这 2 种成分含量的方法。



TPP 为二磷酸硫胺, (1) 为分支酸合酶, (2) 为琥珀酰苯甲酸合酶, (3) 为琥珀酰苯甲酸-CoA 连接酶, (4) 为异戊烯基二磷酸异构酶。

图 1 合成蒽醌的莽草酸途径和萜类途径

Figure 1. Shikimate pathway and terpene pathway for the production of anthraquinones

2.1 茜草愈伤诱导研究进展

薛建平等<sup>[11]</sup>以 MS 培养基为基础,研究了不同植物生长物质及配比对茜草愈伤组织诱导及快速繁殖的影响,指出:MS+2,4-D 2mg/L+KT 0.1mg/L 培养基适于茜草的愈伤, MS+6-BA 1.5mg/L 培养基上茜草茎段能迅速生长成

苗,MS+2,4-D2mg/L+KT 0.1mg/L 培养基+MS+6-BA1.5mg/L 培养基先后使用可使茜草生根。赵文爱等<sup>[12]</sup>研究了茜草愈伤组织的诱导和分化,用 MS 培养基附加 0.01mg/L~5.0mg/L 2,4-D/0.01mg/L~1.0mg/L BA 的不同激素组合,处理茜草带侧芽茎段,均能诱导其产生愈伤组织,并能使

其分化出芽。但不同的激素配比和用量所得诱导率和分化率则不同。但国内这些研究都没有对茜草组织培养物的有效成分进行分析。

## 2.2 影响茜草细胞生长及其有效成分含量的因素

在植物细胞培养时,环境条件强烈影响着细胞的生长及其有效成分的合成,如培养基组成、光照、温度、pH值、外源激素、前体物质、诱导子和通气状况、培养方式等都会对植物细胞培养产生影响。

薛建平等研究报道光照培养不利于茜草愈伤组织的生长,应以暗培养为宜。ZENK M H等<sup>[13]</sup>指出蔗糖较其他碳源有利于蒽醌的合成。SUZUKI H等<sup>[14]</sup>指出在茜草细胞培养中,红光和蓝光对蒽醌的合成有抑制作用以及碳源、氮源等因子对细胞生长及细胞中蒽醌含量的影响。在茜草悬浮培养时葡萄糖较蔗糖更利于蒽醌的合成;硝态氮和氨态氮的比例对细胞培养物的生长和总蒽醌的含量也有较大影响,当两者比例为1:1时最适合细胞生长和蒽醌生成;植物生长物质是影响植物细胞生长和代谢产物积累的重要因素,萘乙酸(NAA)较其他植物生长素有利于细胞生长和蒽醌生产。MISCHENKO N P等<sup>[10]</sup>研究茜草固体愈伤培养表明,NAA和-6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)组合最有利于蒽醌的生产,并且依外植体的来源不同,愈伤组织中蒽醌含量差别也很大,如茎尖愈伤为0.62%,茎段为1.08%,叶片为0.81%。未能从茜草根中诱导出愈伤组织。

## 2.3 提高蒽醌含量的研究进展

在植物细胞培养提高次生代谢产物的过程中,除了可以采用优化培养基、选择最佳培养条件外,还可以通过添加前体物、诱导子,基因操作,代谢调控等方面达到提高次生代谢产物含量的目的。

### 2.3.1 质粒基因转化

发根农杆菌Ri质粒的致癌基因rolB和rolC基因能促进很多植物的次生代谢物的合成<sup>[15-16]</sup>,BULGAKOV V P等<sup>[17]</sup>将rolB和rolC基因转到茜草组织培养物中,得到转基因的愈伤组织,与正常愈伤组织在表型上存在一定差异,正常愈伤组织亮黄色,生长旺盛;转基因的愈伤组织橙色至橙红色,生长较正常,愈伤组织稍慢;正常愈伤组织中蒽醌含量为干重的0.4%~1.2%,而经rolB和rolC基因转化的愈伤组织蒽醌含量可分别为干重的1.9%~3.2%和1.4%~2.3%。表明rol基因能使茜草组织培养物的次生代谢产物含量提高。同时还研究了钙离子通道阻滞剂和蛋白激酶/磷酸酶阻滞剂对转基因茜草愈伤和非转基因茜草愈伤的生长及蒽醌合成的影响。

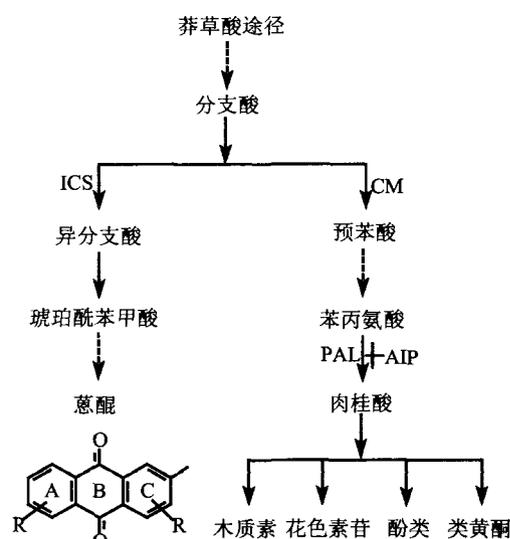
### 2.3.2 诱导子

添加诱导子能够促进植物次生代谢物的积累,在许多植物的组培过程中添加诱导子,使得有效成分含量大大地提高<sup>[18]</sup>。VASCONSUELO A等<sup>[19]</sup>将植物诱导物壳聚

糖(Chitosan)添加到染色茜草(*Rubia tinctorum*)的培养物中,大大地促进了蒽醌的生物合成,产量提高近100%。BUSTO V<sup>[20]</sup>在研究染色茜草悬浮培养时,通过提高流体压力,明显地促进了蒽醌的合成。

### 2.3.3 代谢流调控

PERASSOLO M等<sup>[21]</sup>研究表明可以从代谢途径调控方面提高茜草悬浮培养物中蒽醌的含量,将一定浓度的脯氨酸或氨基茛磷酸(aminoinidan-2-phos-phonicacid,AIP)加入到染色茜草(*Rubia tinctorum*)的悬浮培养物中,蒽醌的含量提高约50%。莽草酸途径代谢产生的分支酸,又经2条代谢途径产生不同的代谢产物:一是经蒽醌途径产生蒽醌类化合物;二是经苯基丙酸类途径(phenylpropanoid pathway)生成肉桂酸(cinnamic acid),再产生其他代谢物。后一条途径中苯丙氨酸(phenylalanine)转化为肉桂酸是关键步骤,催化该步骤的关键酶是苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia liase, PAL),而氨基茛磷酸能抑制该酶的活性。所以培养基中加入AIP可以抑制苯基丙酸类途径,使代谢流偏向生成蒽醌的途径,从而提高蒽醌含量。蒽醌及苯基丙酸类合成途径原理见图2。



ICS为异分支酸合酶,CM为分支酸变位酶,PAL为苯丙氨酸解氨酶,AIP为氨基茛磷酸。

图2 蒽醌及苯基丙酸类合成途径

Figure 2. Schematic diagram of the anthraquinone and phenylpropanoid biosynthetic pathways

水杨酸、甲基茉莉酸在合适浓度范围内能强烈地促进转基因和非转基因茜草愈伤组织中蒽醌的积累,但对于愈伤生长量有一定影响<sup>[22]</sup>。另外,ABDULLAH M A等<sup>[23]</sup>在*Morinda elliptica*的悬浮培养中,分别设计生长培养条件和代谢物生产培养条件,优化了蒽醌的生产。BASSETTI L等<sup>[24]</sup>报道在双液相系统中用硅处理促进了海巴戟(*Morinda Citrifolia*)悬浮培养过程中蒽醌的生产和释放,

这为茜草组织培养生产蒽醌研究提供了参考和借鉴。

### 3 展望

国外在茜草组培方面研究报道较多,国内也有少数人在研究,从以上的研究情况来看,茜草组织培养物主要含有蒽醌类化合物,其含量虽然较原植物高出很多,但与一些其他植物相比还有待提高,如 ZENK M H 等<sup>[13]</sup>采用海巴戟悬浮细胞培养生产蒽醌的研究中,总蒽醌含量达到了细胞干重的 10%。随着生物工程与生物技术的发展,通过对茜草中蒽醌生物合成步骤和相关酶的深入研究和了解,可以在植物组织(细胞)培养中利用酶学、基因操作、代谢工程等手段定向地调节生物合成途径,提高茜草培养物中有效成分的含量。由于植物细胞悬浮培养时细胞对剪切力比较敏感,所以在发酵设备方面也需要针对植物细胞的特性设计相关的发酵罐;并可以结合固定化细胞培养技术、连续发酵技术、分段培养技术使生产得到优化,在有效成分提取方面也要进行更深入地研究,以期最大限度地从细胞中提取出有用的代谢物。另外,随着茜草种类和产地的不同,其有效成分的含量也有所不同<sup>[20]</sup>,以后随着植物细胞培养技术的成熟,也可以在生产环己肽方面进行探索。

### 参考文献:

- [1] 冯松杰,蒋继福,曾安平. 茜草治疗白细胞减少症 32 例[J]. 陕西中医, 2000, 21 (3): 102.
- [2] 杨念云,田丽娟. 茜草属植物的化学成分和药理作用[J]. 国外医药·植物药分册, 2005, 20 (2): 53-55.
- [3] 陈寅生,李武营. 茜草中多糖成分的提取分离与抗辐射作用的实验研究[J]. 河南大学学报, 2004, 23 (1): 32-34.
- [4] 尹江宁,高峻玉. 茜草多糖的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25 (1): 128-129.
- [5] 康文艺,臧鑫炎,李黎. 茜草抗氧化成分研究[J]. 河南大学学报, 2006, 25 (3): 6-8.
- [6] 田金改,王钢力,陈德昌. 中国茜草与欧茜草的 X 射线粉末衍射分析[J]. 分析测试学报, 1999, 19 (1): 38-40.
- [7] 高锦明. 植物化学[M]. 科学出版社, 2003: 113-114.
- [8] HAN Y S, HEIJDEN V R, VERPOORTE. Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of the Rubiaceae [J]. Pl Cell Tis, 2001 (67): 201-220.
- [9] SUZUKI H, MATSUMOTO T, MIKAMI Y. Effects of nutritional factors on the formation of anthraquinones by *Rubia cordifolia* plant cells in suspension culture [J]. Agric Biol Chem, 1984, 48 (3): 603-610.
- [10] MISCHENKO NP, FEDOREYEV SA, GLAZUNOV V P, et al. Anthraquinone production by callus cultures of *Rubia cordifolia* [J]. Fitoterapia, 1999 (70): 552-557.
- [11] 薛建平,张爱民,程建平. 茜草愈伤组织诱导与快速繁殖的研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27 (2): 101-103.
- [12] 赵文爱,季淑海. 药用植物茜草茎段的组织培养[J]. 医学动物防疫, 1999, 15 (15): 202-204
- [13] ZENK M H, EL-SHAGI H, SCHULTE U. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia* [J]. Planta Med, 1975, (Suppl): 79-101.
- [14] SUZUKI H, MATSUMOTO T, MIKAMI Y. Effects of physical factors and surface active agents on the formation of anthraquinone by *Rubia cordifolia* cells in suspension culture [J]. Agric Biol Chem, 1985 (48): 519-520.
- [15] BULGAKOV V P, KHODAKOVSKAYA M V, LABETSKAYA N V, et al. The impact of plant rolC oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures [J]. Phytochemistry, 1998 (49): 1929-1934.
- [16] BONHOMME V, LAURAIN MATTAR D, FLINIAUX M A. Effects of the rolC gene on hairy root: Induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna* [J]. Nat Prod, 2000 (63): 1249-1252.
- [17] BULGAKOV V P, TCHERNODED G K, MISCHENKO N P, et al. Effects of Ca<sup>2+</sup> channel blockers and protein kinase/phosphatase in hibitors on growth and anthraquinone production in *Rubia cordifolia* callus cultures transformed by the rolB and rolC genes [J]. Planta, 2003 (217): 349-355.
- [18] 崔堂兵,郭勇,林炜铁. 提高植物细胞培养法生产次级代谢物产量的方法[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37 (3): 479-482.
- [19] VASCONSUELO A, GIULIETTI A M, POCOTTO G, et al. Involvement of the PLC/PKC pathway in chitosan-induced anthraquinone production by *Rubia tinctorum* L. cell cultures [J]. Plant Sci, 2003 (165): 429-436.
- [20] BUSTO V, GIULIETTI M A, TALOU R J. Hydrodynamic stress induces anthraquinones production in *Rubia tinctorum* cell suspension cultures [J]. J Biotechnol, 2007, 131 (2): S43-S47.
- [21] PERASSOLO M, QUEVEDO C, BUSTO V, et al. Enhance of anthraquinone production by effect of praline and aminoindan-2-phosphonic acid in *Rubia tinctorum* suspension cultures [J]. Enzyme Microb Technol, 2007 (41): 181-185.
- [22] BULGAKOV V P, TCHERNODED G K, MISCHENKO N P, et al. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the rolB and rolC genes [J]. Biotechnol, 2002 (97): 213-221.
- [23] ABDULLAH M A, ALI A M, MARZIAH M, LAJIS N H, ARIFF A B. Establishment of cell suspension cultures of *Morinda elliptica* for the production of anthraquinones [J]. Pl Cell Tis, 1998 (54): 173-182.
- [24] BASSETTI L, PIJNENBURG J, TRAMPER J. Silicone-stimulated anthraquinone production and release by *Morinda Citrifolia* in a two-Liquid-Phase system [J]. Biotechnol Lett. 1996 (18): 377-382.
- [25] 孙文基,谢世昌. 天然药物成分定量分析[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 17-18.

《中国酿造》竭诚为您服务!