

青蒿素生物合成机理研究现状

赵兵 王玉春[✓] 欧阳藩

(中国科学院化工冶金研究所生物工程国家重点实验室, 北京 100080)

76064
2946-33

摘要 本文总结了目前有关青蒿素生物合成机理方面的研究, 主要包括青蒿素生物合成中生理因子的影响, 青蒿素生物合成中间体及前体, 青蒿素生物合成细胞定位等, 指出了存在的一些问题及今后的研究发展前景。

关键词 青蒿素; 生物合成; 机理

Advances of research in mechanism of bio-synthesis of Artemisinin

Zhao Bing Wang Yuchun Ouyang Fan

(State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract This paper summarized the present research works in mechanism of bio-synthesis of Artemisinin, which included the effects of physiological and environmental factors, intermediate products and precursors of Artemisinin, the location in the plant relevant to bio-synthesis and sequestration, and so on. The problems and prospects in the studies were discussed.

Key words Artemisinin; bio-synthesis; mechanism

自从青蒿素由我国学者于七十年代初期首次从药用植物黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 中分离出来, 由于它优于其它抗疟疾药物, 特别是对脑型及抗氯喹恶性疟疾有特殊疗效, 逐步引起世界各国研究者的极大兴趣, 被 WHO 称为“是世界上目前唯一有效的疟疾治疗药物”。我国及世界各国科学家在青蒿素化学结构的基础上开发出一系列衍生物, 其药效大大提高, 应用范围亦日益扩大。目前世界上对青蒿素及其衍生物的研究的热潮正在兴起, 某些研究结果已显示出它们对艾滋病等有疗效。黄花蒿中含有多种药用成分, 它们具有抗菌、抗寄生虫, 解热以及促进免疫等作用, 且毒性极低, 无副作用^(1~3)。

黄花蒿为一年生草本植物, 在我国分布很广, 但青蒿素含量一般较低 (0.1%~0.6%), 野生或人工栽培的黄花蒿一般在盛叶期和花蕾期青蒿素含量最高。应用基因工程, 细胞工程等技术手段提高青蒿素含量, 采用生物反应器技术大规模组织培养生产青蒿素成为世界上研究的热点。中科院化冶所, 中科院植物所等单位承担的国家“九·五”攻关项目“大规模植物细胞培养生产青蒿素”, 已利用发根农杆菌诱导出青蒿素含量较高的黄花蒿发根, 正在利用基因工程技术进一步提高青蒿素含量, 同时

1998-04-29 收稿

第一作者简介: 赵兵, 男, 1966 年出生, 博士, 副研究员, 从事植物组织大规模培养及植物天然产物分离提取研究工作。

研究了适用于黄花蒿发根及芽培养的新型生物反应器及控制技术, 为大规模利用生物技术生产青蒿素打下了基础^[4-5]。

采用基因工程方法, 必须对青蒿素及其衍生物的生物合成机理有所了解, 才能更加有效快捷地大量提高青蒿素等药用成分含量, 本文就目前青蒿素生物合成方面的研究进行总结, 希望能对今后青蒿素的研究开发有所裨益。

1 青蒿素生物合成中生理生态因子的影响

在整个黄花蒿生长和青蒿素合成过程中植物生理生态因子都有重要影响, 下面是目前有关黄花蒿生理生态因子的研究结果。

1.1 光照影响 陈福泰等^[6]研究认为在人为控制的环境中同一生长期的黄花蒿植株, 在形态上有显著差异, 但这种差异与青蒿素含量无相关性, 只要黄花蒿最基本的生长条件得到满足, 生长环境中营养物质含量及生长基质对青蒿素含量无影响, 但高温(30℃)及短距离光照使青蒿素含量成百倍增长。高温及短距离光照有利于青蒿素合成和积累, 但二者中哪一种因素起主要作用以及合成代谢中的分子机理和调节作用机制均有待于进一步研究。陈和荣等^[7]在黄花蒿组织培养中发现蓝光较白光有利于愈伤组织分化成芽, 中药材人参煮沸液加在培养基中, 可提高芽分化率, 缩短分化时间; 加入B₁₂注射液提高了分化芽根的诱导率, 并可壮茎促进小植株生长, 缩短诱导时间。钟凤林等^[8]以四川西阳、福建厦门、湖北咸宁、北京通县人工栽培的黄花蒿为对象, 研究了黄花蒿的最佳采收期、采收部位和干燥方式, 结果表明: 青蒿素含量在生长盛期至花(蕾)期之前最高; 中午12时至下午16时青蒿素含量处于最高状态; 在黄花蒿单株及枝条的上部叶片青蒿素含量最高, 中部次之, 下部最低, 上部叶片青蒿素含量可比下部叶片高1倍左右, 这亦说明了光照对青蒿素合成有重要影响。在晒干、阴干、烘干三种干燥方式中以晒干青蒿素含量最高, 其次是阴干, 最后是烘干。李典鹏等^[9]对广西不同产地黄花蒿中青蒿素含量分析比较表明: 人工栽培比野生高。这说明人工栽培的肥效、人工护理等有利于青蒿素积累; 日照对青蒿素含量影响很大, 日照充足, 干燥地带青蒿素含量高; 相反生长在阴暗潮湿地带, 如树荫下、水沟旁青蒿素含量较低。上述研究结果与陈和荣等^[10]提出的光照有利于青蒿素产生和积累的理论一致。

1.2 外源激素影响 Basile等^[11]较为详细地研究了外源激素对黄花蒿组织培养及细胞培养中青蒿素合成的影响。但他们在培养产物中未能检测到青蒿素及其前体, 如青蒿酸等。Woerdenbag等^[12]在培养时加入10 mg/L GA, 0.5 g/L 水解酪蛋白, 10 mg/L 或20 mg/L naftine 均能增加青蒿素产量。Liersch等^[13]研究发现青蒿素含量在花蕾期最高, 用激素型生长调节剂CCC (Chlorocholine Chloride) 矮壮素处理后, 青蒿素含量较对照样高30%。

1.3 芽分化的影响 Fuzzele等^[14]研究黄花蒿组织培养中青蒿素合成后认为, 根从不定芽上启动时, 青蒿素及青蒿素B的合成就开始, 而且培养的不定芽完全分化是青蒿素合成的先决条件。Jha等^[15]在进行发根和芽的离体培养时, 在两种培养产物中都成功地合成了青蒿素。Paniego等^[16-17]研究农杆菌诱导的发根芽培养时发现, 改变RT Vitamin 复杂培养基(MSRT)中Ca²⁺, Mg²⁺, PO₄³⁻浓度不能增加青蒿素含量, 增加生长调节剂, 如GA₃却能使青蒿素含量较对照样增加3~4倍。未分化的黄花蒿培养产物青蒿素含量很低, 相反分化后含量却很高。这亦说明培养时一定程度的分化是青蒿素合成的先决条件。

1.4 其他因素 青蒿素含量在黄花蒿整个植株中的各个部分差异很大, 而且明显受到生长期中各种环境因素影响, 如营养条件, 光照, 外源激素等。田间栽种或野生黄花蒿叶中青蒿素含量往往较高,

而且在开花前的盛叶期达到最高点^[18]。Woerdenbag等^[19]发现黄花蒿生长到5个月时,黄花蒿的叶产量及青蒿素含量达到最高(0.86%,干重),然后开始下降。Elhag等^[20]发现高青蒿素含量的植株具有长的节间,茁壮的茎秆,伸展开的枝条和茂密的叶。Nin等^[21]研究黄花蒿毛状根后认为1星期的对数生长期后是2星期的指数生长期,指数生长期代谢活动减少,最后(24~28 d)进入静止期。Inomata等^[22]认为代谢活动的减少主要同蔗糖转化为葡萄糖、果糖,以及对这些产物的利用率降低有关。Nguyen等^[23,24]却认为代谢活动的减少主要与渗透压(osmotic stress)有关。

2 青蒿素生物合成中间体研究

要透彻了解青蒿素在植物体内合成途径,必须了解合成青蒿素的生源、中间体及关键酶。各国研究者都希望通过研究青蒿素合成过程中主要的前体来了解青蒿素生物合成过程,从而可以利用基因工程等手段来极大地提高黄花蒿种子质量和生物培养产物青蒿素含量。

2.1 青蒿酸 汪猷等^[25]以青蒿酸为前体用黄花蒿匀浆体系进行了青蒿素及青蒿素B的生物合成。黄敬坚等^[26]应用幼苗水插法和顶株扦插法,在黄花蒿体内以[2-¹⁴C]-3,5-二羟基-3-甲基戊酸- δ -内酯([2-¹⁴C]-MVA)为前体,成功地合成了青蒿酸。上述两项研究表明在黄花蒿由MVA生物合成青蒿素和青蒿素B的途径中,青蒿酸是关键性的中间体。夏志强等^[30]报道了青蒿酸甲酯用NBS溴化产生溴化物,经NaBD₃CN或NaBD₄氘解,生成[15-²H]-青蒿酸甲酯,再经水解生成[15-²H]-青蒿酸。用同样方法以NaB³H₄为氘化试剂和溴化反应,合成了[15-³H]-青蒿酸。Weather等^[28]在发根农杆菌ATCC15834诱导的黄花蒿发根培养产物中检测到了青蒿素的生物合成前体,包括青蒿素B、青蒿酸、青蒿烯(Artemistene)。Jung等^[29]认为黄花蒿中青蒿酸含量是青蒿素的8~10倍。由于青蒿酸在黄花蒿中含量高,且具有适宜的化学构像,它是合成青蒿素及其衍生物的有用手性合成单体(Chiral Synthone)及前体。在以青蒿酸为前体生物合成青蒿素等过程中,光氧化环化反应(photooxidation cyclization)是关键性步骤。他们提出了以青蒿酸为前体生物合成青蒿素及其衍生物的途径。

2.2 青蒿烯 Akihila等^[27]报道了[³H, ¹⁴C-22]标记(3RS)-MVA到青蒿素和青蒿素B的转化。Kudakasseril等^[31]用无细胞体系方法进行[¹⁴C]-异戊烯基焦磷酸到青蒿素的转化。然而他们并未将青蒿酸考虑为生物合成青蒿素关键的中间体。Annemicke Vergauwe等^[32]认为利用基因工程手段得到的黄花蒿转基因植株,可以通过刺激青蒿素合成中某个关键酶的过量表达(overexpressing)和抑制消耗青蒿素合成前体的其他代谢途径中的关键酶来达到青蒿素稳定高产的目的。Brown等^[33]从青蒿的地上生长部分(aerial parts)分离出了新颖的开环杜松烷(secocadinane)和二羟基杜松交酯(dihydroxycadinanolide),并用¹H和¹³C NMR光谱学鉴定了其结构,并提出了由青蒿素B和青蒿酸通过二羟基杜松交酯和4,5开环杜松烷的醇烯互变体(the enol tautomer)生物合成青蒿素的机理。青蒿素B是黄花蒿中最丰富的杜松交酯,所提出的生物合成机理与现有的几个青蒿素化学合成过程相比具有很多相似之处。

3 青蒿素生物合成细胞定位研究

Ferreira等^[34]研究黄花蒿叶形貌时,在头状花序(the capitulum)小花的花冠(corolla of florets),花托(receptacle),苞片(bracts)中发现了很多透明的与青蒿素合成有关的腺状细胞列。在头状花序的苞片和花梗(pedicels)中发现了无腺的丝状(filamentous)T细胞列。Duke等^[35]研究认为双列的(biseriate)十细胞腺状细胞列是青蒿素汇集(sequestration)的场所。因为能够通过

浸在氯仿中 5 s 而不损坏其表皮 (epidermis) 的情况下从腺状同系 (a glanded biotype) 叶中提取得到青蒿素 B 及青蒿烯 (Artemisitene), 而在无腺的同系细胞中却没有青蒿素及青蒿烯。Ferreira 等^[34] 在小花中描述的双细胞列与 Duke 等^[36] 在叶中描述的一致。他们研究后均认为这些腺状细胞列同时亦是合成黄花蒿油的场所, 它们在雌花 (pistillate) 和两性小花 (hermaphroditic florets) 中可以从早期的发育中分辨出来。Duke 等^[36] 认为叶细胞列从一对细胞发展而来, 经过一系列的分化后形成十细胞结构。叶细胞列中的一个腺具有两个柄细胞 (stalk cell) 及 8 个腺状细胞, 顶端细胞 (apical) 分布在腺细胞列的皮下 (subcuticular) 空间。在叶生长期, 象叶细胞列一样在腺状细胞列顶端皮下空间扩大成囊 (sac) 形结构。细胞列外皮 (cuticle) 在开花期 (anthesis) 破裂 (rupture) 释放其中的物质给小花 (florets)。Ferreira 等^[37] 认为黄花蒿中丰富的花腺状细胞列 (floral glandular trichomes) 在开花期 (anthesis) 中青蒿素含量最高, 同时在 inflorescences 中含量较叶中高。可以从黄花蒿花序中用有机溶剂浸提 60 s 得到青蒿素, 这个事实实际上支持了 Duke 等^[35] 青蒿素在这些腺体中汇集的结论。开花时青蒿素含量达到最高可能是由于青蒿素含量随叶腺状细胞列逐渐达到生理成熟而增加。

如果腺状细胞列是青蒿素及其相关化合物合成及汇集场所, 那就需要建立发展免疫细胞化学 (immunocytochemical) 及生化技术。Ferreira 等^[38] 认为腺状细胞列同青蒿素汇集相关的结论澄清了现有文献中的大量问题, 如组织分化的作用, 同青蒿素产生相关的器官, 达到青蒿素含量最高的最佳收获时间以及黄花蒿中的青蒿酸等。青蒿素产生于特定的腺细胞解释了未分化愈伤组织或细胞为什么不能产生青蒿素。在种子中青蒿素的存在同用于描述分子进化花的残迹 (floral remnant) 有关。

4 结束语

虽然青蒿素及其衍生物已能化学合成, 但由于其毒性太大, 成本太高, 青蒿素及其衍生物的主要来源仍然是生物途径。而野生或人工栽培黄花蒿青蒿素含量均较低, 且受自然条件影响很大, 所以生物技术及生化工程技术的研究应用显得愈来愈重要。对青蒿素生物合成途径的研究可以给采用基因工程等技术手段大大提高青蒿素合成能力提供基础。

目前虽已初步确定青蒿素合成与腺细胞列有关, 但仍然需要免疫组织化学 (immunohistochemical) 研究来进一步确证合成地点。由于多克隆系抗体同青蒿素及相关化合物的交叉反应, 通过透射电镜从免疫金 (immunogold) 标记得到的信号可能是这些抗体同青蒿素以及在组织样品中存在的结构相关化合物反应结果。

在青蒿素生物合成机理研究基础上, 对黄花蒿种子及转基因植物研究的同时, 需加强黄花蒿组织培养中组织、器官建成的生理生化基础研究。采用前体标记方法研究青蒿素生物合成的主要途径及关键酶, 进一步确证青蒿素的合成部位及释放行为, 以加强各种调控手段在提高青蒿素及其衍生物生产能力上的有效性。

参 考 文 献

- 1 Klayman D L. Qinghaosu (Artemisinin). An antimalarial drug from China. *Science*, 1985, 228: 1049~1054
- 2 冯文宇, 李丙元. 青蒿素研究进展. *中草药*, 1990, 21 (8): 38~41
- 3 谢德玉, 叶和春, 李国风. 青蒿素研究进展—生物技术应用及前景. *植物学通报*, 1995, 12 (4): 28~31
- 4 Liu C, Wang Y, Ouyang F. *et al.* Production of Artemisinin by hair root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnology Letters*, 1997, 19 (9): 927~929
- 5 蔡国琴, 李国珍, 叶和春等. R1质粒转化的青蒿发根培养及青蒿素的生物合成. *生物工程学报*, 1995, 11 (4): 315~320

- 6 陈福泰, 张桂华. 药用青蒿植株中青蒿素合成的若干生理因子研究. 植物生理学通讯, 1987, (5): 26~30
- 7 陈和荣, 陈敏, 陈福太等. 药用青蒿 (*Artemisia annua*) 的组织培养II. 中药通报, 1986, 11 (2): 10~11
- 8 钟凤林, 陈和荣, 陈敏. 青蒿最佳采收时期, 采收部位和干燥方式的实验研究. 中国中药杂志, 1997, 22 (7): 405~406
- 9 李典鹏, 梁小燕, 陈秀珍等. 采用薄层层析—紫外分光光度法测定广西不同产地黄花蒿中青蒿素含量. 广西植物, 1995, 15 (3): 254~255
- 10 陈和荣, 陈敏, 钟凤林等. 影响青蒿有效成分的几个因子. 中药通报, 1986, 11 (7): 9
- 11 Basile D V, Akhtari N, Durand Y, et al. Effects of plant hormones on cell and tissue cultures of *Artemisia annua* L. In vitro Cell Dev. Biol., 1993, 29P: 143~147
- 12 Woerdenbag H J, Jos F J, Win Yan Uden, et al. Production of the new anti-malarial drug artemisinin in shoot culture of *Artemisia annua* L. Plant Cell, Tissue, Callus Culture and Org. Culture, 1993, 32: 247~257
- 13 Liersch R, Soicke H, Stehr C, et al. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* During one Vegetation Period. Planta Medica, 1987, 52: 387~390
- 14 Fuzzele D P, Sipabimalani A T, Heble M R. Tissue cultures of *Artemisia annua* organogenesis and artemisinin production. Phytotherapy Research, 1991, 5: 149~153
- 15 Jha S, Jha B T, Mahayo S B, et al. Tissue Culture of *Artemisia annua*. J. Nat. Prod., 1988, 49: 504~507
- 16 Paniego N B, Giulietti A M. Artemisinin Production by *Artemisia annua* L. —transformed organ culture. Enzyme and Microbiology Tech., 1996, 18: 526~530
- 17 Paniego N B, Giulietti A M. Dedifferentiated and differentiated cultures. Plant Cell, Tissue, Callus Culture and Org. Culture, 1994, 36: 163~168
- 18 四川省中药研究所药化室抗疟药小组. 抗疟药青蒿的研究. 中草药通讯, 1979, 1: 5~12
- 19 Woerdenbag H J, Pras N, Chan N G, et al. Artemisinin, related sesquiterpenes, and essential oil in *Artemisia annua* during a vegetation period in Vietnam. Planta Medica, 1994, 60: 272~275
- 20 Elhag H M, El-Domiary M M, El-Ferali F S, et al. Selection and micropropagation of high artemisinin producing clones of *Artemisia annua* L. Phytotherapy Research, 1992, 6: 20~24
- 21 Nin S, Bennici A, Rosselli G, et al. Agrobacterium-mediated transformed of *Artemisia absinthium* L. (worm wood) and production of Secondary Metabolites. Plant Cell Reports, 1997, 16: 725~730
- 22 Inomata S, Yokoyama M, Gozu Y, et al. Growth pattern and ginsenoside production Agrobacterium-transformed *Panax ginseng* roots. Plant Cell Reports, 1993, 12: 681~686
- 23 Nguyen C, Bourgard F, Fortol P, et al. Establishment of hair root cultures of *Psoralea species*. Plant Cell Reports, 1992, 11: 424~427
- 24 Hamill J, Rounsley S, Spencer A, et al. Secondary product formation by cultures of *Beta-Vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Reports, 1986, 5: 111~114
- 25 汪猷, 夏志强, 周凤仪等. 青蒿素生物合成研究III. 化学学报, 1988, 46: 1152~1153
- 26 黄敬坚, 周凤仪, 吴莲芬等. 青蒿素生物合成研究I. 化学学报, 1990, 48: 275~277
- 27 Aibila A, Thakur R S, Popli S P. Biosynthesis of Artemisinin in *Artemisia annua*. Phytochemist, 1987, 26: 1927
- 28 Weather P J, Cheetham R D, Follansbee E, et al. Artemisinin Production by Transformed roots of *Artemisia annua*. Biotechnology Letters, 1994, 16 (2): 1281~1286
- 29 Jung M, Elsobly H N, Mc Chesney J D. Artemisinic acid, Avestile Chira Sython and Bioprecursor to natural products. Planta Medica, 1990, 56: 624
- 30 夏志强, 黄敬坚, 汪猷等. 青蒿素生物合成研究II. 化学学报, 1991, 49: 1514~1518
- 31 Kudakasseril G J, Lam L, Staba E J, et al. Effects of sterol inhibitors on the incorporation of ^{14}C -isopentenyl pyrophosphate into artemisinin by a cell free system for *Artemisia annua* tissue cultures and plants. Planta Medica, 1987, 53: 280
- 32 Brown G D. Cadinanes from *Artemisia annua* that may be intermediates in the biosynthesis of Artemisinin. Phytochemistry, 1994, 36 (3): 637~641
- 33 Vergauwe A, Cammaert R, Yaandenbergh D, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformed of *Artemisia annua* L. and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports, 1996, 15: 929~933
- 34 Ferreira J F S, Janick J. Floral Morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. Int. J. Plant Sci, 1995, 156 (6): 807~815
- 35 Duke M V, Paul R N, El-Sobly H N, et al. Location of artemisinin and artemisitenone in foliar tissue of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. Int. J. Plant Sci, 1994, 155 (3): 365~372
- 36 Duke S O, Paul R E. Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L. Int. J. Plant Sci, 1993, 154 (1): 107~118
- 37 Ferreira J F S, Simon J E, Janick J. Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. Planta Medica, 1995, 61: 167~170
- 38 Ferreira J F S, Janick J. Production and detection of artemisinin from *Artemisia annua*. Acta Horticulture (Medicinal and Aromatic Plants), 1995, 390: 41~49