

贯叶连翘中金丝桃素的合成与积累研究进展

吴建铭, 祝建*, 夏春镗, 宋馨

(同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

摘要: 金丝桃素是贯叶连翘的主要药理活性成分。本文概述了金丝桃素的化学与生物合成途径, 介绍了金丝桃素在贯叶连翘个体发育过程中的积累以及利用贯叶连翘的细胞和组织培养技术生产与积累金丝桃素的研究进展。最后, 指出分子生物学和电子显微镜技术的发展为深入研究金丝桃素的产生和积累提供了有利工具。

关键词: 贯叶连翘; 金丝桃素; 生物合成; 细胞培养; 组织培养; 综述

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)03-0263-06

Progress in Synthesis and Accumulation of Hypericin in *Hypericum perforatum* L.

WU Jian-ming, ZHU Jian*, XIA Chun-tang, SONG Xin

(School of life science and technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Hypericin is a major bioactive constituent of *Hypericum perforatum* L.. Its chemical and biological synthesis pathways are provided. Progresses in the study of hypericin accumulation in plant individual development and microcultures of *H. perforatum* are also reviewed. Further studies of hypericin can be performed using molecular markers and electronic microscopy.

Key words: *Hypericum perforatum* L.; Hypericin; Biosynthesis; Cell culture; Tissue culture; Review

贯叶连翘(*Hypericum perforatum* L.), 又称贯叶金丝桃、小对叶草、千层楼, 是藤黄科(Garcinia)金丝桃属(*Hypericaceae*)的代表植物, 广泛分布于南部非洲、欧洲、亚洲和我国山东、河北、陕西、江苏、四川、贵州等省^[1]。因其主要药理活性成分金丝桃素具有良好的抗病毒、抗肿瘤活性, 所以加速了人们对其野生资源的过度采集。金丝桃素亦可以通过贯叶连翘植物的细胞及组织培养技术而产生, 这是金丝桃素另一来源。本文综述了金丝桃素合成路径以及近年来金丝桃素在贯叶连翘个体发育或细胞与组织培养中的积累等研究, 旨在为金丝桃属植物资源及其有效活性成分的研究和开发提供参考。

1 金丝桃素概述

1830年, Bucher^[2]首次发现贯叶连翘的活性成分是金丝桃素。Cerny将它命名为 hypericin^[2]。此后对金丝桃素的研究主要集中在药理作用、活性成分的提取检测以及如何提高他在植物细胞组织培养中的含量等方面。近年来, 人们发现金丝桃素具有显著的抗癌抗肿瘤和抗DNA、RNA病毒的作用, 包括艾滋病免疫缺陷病毒(HIV)和禽流感(H₅N₁和H₉N₂)病毒^[3-5]。

金丝桃素的化学名为4,4',5,5',7,7'-六羟基-2,2'-二甲基-中位-萘并二萘酮, 分子式C₃₀H₁₆O₈, 属于萘并二萘酮类化合物, 其衍生物包括: 伪金丝桃

收稿日期: 2006-9-11

接受日期: 2007-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30470863)资助

* 通讯作者 Corresponding author

素(pseudohypericin),原金丝桃素(protohypericin)、原伪金丝桃素(protopseuhypericin)、环伪金丝桃素(cyclopseuhypericin)、异金丝桃素(isohypericin)及大黄素-蒽酮(amodin-anthrone)等^[6]。金丝桃素分子上下对称,一侧有疏水性甲基,而其他部位均连接有亲水性的取代基,结构式见图 1。

金丝桃素是蓝黑色针状结晶体,熔点为 320℃,易溶于吡啶和其它有机胺类,呈橙红色并带红色荧光;可溶于碱性水溶液中与铅、镁、铁等重金属形成螯合物并沉淀,pH 值大于 11.5 时溶液呈绿色并带有红色荧光,pH 值小于 11.5 时溶液呈红色;不溶于常见的有机溶剂^[7]。该性质是鉴定金丝桃素的重要依据。

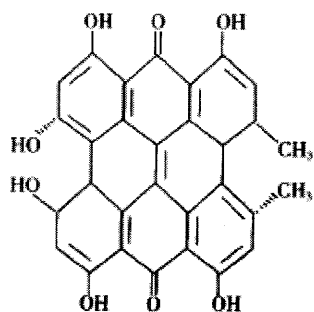


图 1 金丝桃素结构式

Fig. 1 Chemical structure of hypericin

2 金丝桃素合成与积累

2.1 金丝桃素的合成

Brockmann 等^[8]于 1957 年从贯叶连翘和大叶金丝桃(*H. hirsutum* L.)中首次分离得到金丝桃素,并以 3,5-二甲氧基苯甲酸甲酯为原料合成金丝桃素,具体合成路线见图 2。

化学合成为有效解决金丝桃素资源短缺和减少人们对金丝桃属植物野生资源的破坏提供了理想途径,但这些方法^[1]大多合成路线长、收率低或原料不易得、反应条件苛刻,不适合工业化生产。

植物提取是金丝桃素的另一主要来源,但是植物体内的金丝桃素含量低且不易分离纯化,很大程度上限制了其深入研究和开发应用。分子生物学技术的发展和各种微量检测手段使金丝桃素在植物体内生物合成及代谢路径的研究更为深入。目前,普遍认为^[9-10]金丝桃素体内生物合成途径为醋酸酯-丙二酸酯(Acetate-Melonate)途径,乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 参与合成产生大黄醌或大黄素,再由两分子大黄醌或大黄素在酶作用下产生金丝桃素。Bais 等^[11]在悬浮培养的贯叶连翘细胞中检测到了微量的大黄素,并且找到 1 个能够将大黄素转化为金丝桃素的酶,认为大黄素极有可能是金丝桃素的前体之一。该成果极大地推进了金丝桃素的生物合成研究。Zobayed 等^[10,12-13]对不同条件下培养的贯叶连翘不同组织内黑色腺点进行观察,并对不同发育阶

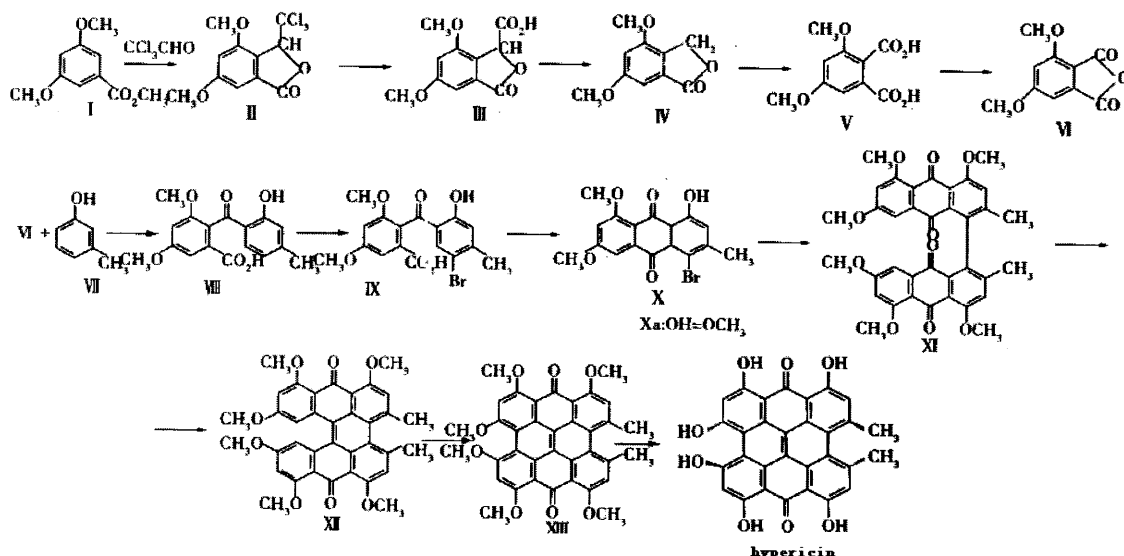


图 2 金丝桃素的化学合成路径^[1]

Fig. 2 Chemsynthesis pathway of hypericin^[1]

段的主要有效成分进行检测,初步确定贯叶连翘植株体内金丝桃素是由大黄素经过一系列氧化缩合反应而成的生物合成路径(图 3)。这为研究金丝桃素代谢过程中各中间产物的合成调控机制及其精确定位提供了理论基础。

2.2 金丝桃素的累积

2.2.1 金丝桃素在贯叶连翘个体发育过程中的积累

虽然贯叶连翘的应用已有较长历史,且对其主要药理活性成分的分析也有深入研究,但对植物体中产生和储存这些物质的分泌结构的研究开展较晚。20 世纪 90 年代初,分类学家开始对贯叶连翘及其他金丝桃属植物产生次生代谢物的腺体进行形态学研究,并把贯叶连翘地上部分的分泌结构分为 3 类:分泌囊(secretory cavities, translucent dots)、分泌细胞团(secretory cell globules, black dots)、分泌道(secretory ducts, translucent streaks)。Southwell 等^[14]对贯叶连翘不同器官中的金丝桃素含量和分泌细

胞团(黑色腺点)密度进行了对比,发现二者具有正相关性。刘文哲等^[15]确定了金丝桃素类物质是在分泌细胞团中合成并积累的,并证明分泌囊和分泌道中的分泌物所含成分为油类物质,而非金丝桃素类物质。吕洪飞等^[16]证实了在金丝桃属只有具有分泌细胞团结构的植物才含有金丝桃素。

吕洪飞等^[17]发现贯叶连翘分泌细胞团主要存在于贯叶连翘的叶边缘、花瓣、萼片、花药和茎棱上,起源于幼叶的基本分生组织,发育过程与叶的形成基本是同时进行的。分泌细胞团的原始细胞经垂周和平周分裂形成一团细胞,其周围的 2-3 层细胞分化成长条状鞘细胞,随着中间细胞数增加,体积增大,最后叶肉细胞开始形成栅栏组织和海绵组织,而在叶的边缘发育形成了由 2-3 层扁平鞘细胞包围一群排列紧密的分泌细胞的分泌结构。

在成熟植株中,随着分泌细胞团的发育,金丝桃素类物质逐渐产生并积累。但是在细胞水平上进行有关金丝桃素类物质或其前体物质产生和积累

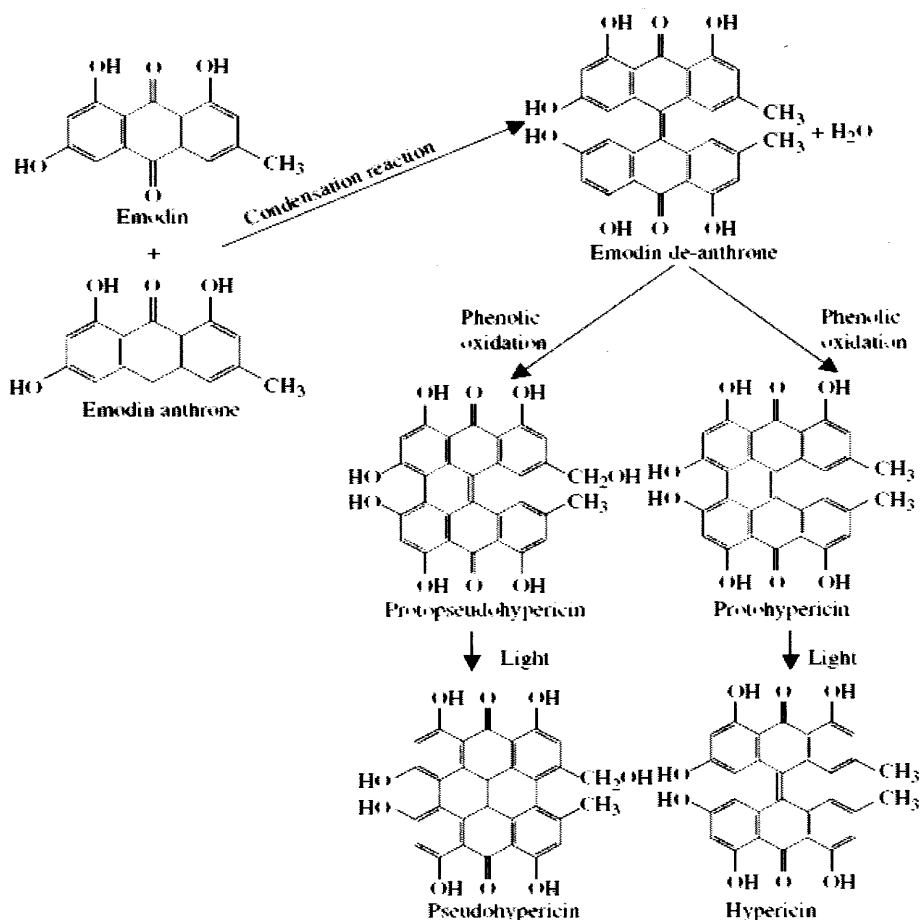


图 3 植物体内金丝桃素的生物合成路径(仿 Zobayed)^[13]

Fig. 3 Biosynthesis pathway of hypericin (after Zobayed)^[13]

的研究并不多见。Liu^[18]认为质体是金丝桃素类物质前体物质的合成位点。在嗜钺物质(金丝桃素类物质)没有出现之前,质体中有着色深的类囊体。在分泌细胞的发育过程中,质体数量逐渐增多,体积增大,并且着色变深。到早期分泌细胞团形成时,质体开始破裂并向细胞质释放着色深的物质,游离高尔基体及内质网协助这些物质转运至液泡,此时液泡中出现嗜钺物质。在中期分泌细胞团细胞中,仍可见到着色深的质体。到分泌细胞团发育成熟时,其细胞中细胞质明显减少,中央大液泡占据大部分体积并积累了大量嗜钺物质。Onelli 等^[19]观察到早期分泌细胞具有分生细胞的特点,巨大的细胞核,核仁明显,细胞质多,有分散的小泡且含有内含物,自由核糖体丰富,液泡中有电子密度高的嗜钺物质,不同的是他们没有观察到质体,中后期的分泌细胞中细胞器开始降解,细胞质非常浓密,细胞角落堆积大量多泡结构,细胞壁中出现黑色物质。他们认为细胞质中大量的自由核糖体参与了分泌物形成过程相关加工酶的合成。

Zobayed 等^[13-14,16]研究了贯叶连翘个体发育过程不同时期叶片上金丝桃素含量变化与黑色腺点数量及光合作用率的关系^[13],发现黑色腺点内含有较高浓度的前体物质大黄素,但周围的组织细胞中却不存在,并进一步确定了在植物体内金丝桃素只能在黑色腺点这种特殊的分泌结构上才能合成,且金丝桃素浓度与黑色腺点数量呈正相关的结论。他们还发现处于生长期(3-6周)的植株叶片光合作用率与金丝桃素浓度成一定的线性关系,而在再生阶段(8-11周)这种线性关系并不明显,认为金丝桃素有可能是通过光合作用、脂肪酸代谢路径等在细胞质中进行初生代谢物(如乙酸、丙二酸等)的积累,进而通过一系列复杂的物质转运过程和酶促反应来合成金丝桃素^[13],但由于缺乏特异的标记物,金丝桃素在体内合成积累后的具体的转运机制尚不清楚。

根据对成熟植株分泌细胞团发育的研究,虽然确定了金丝桃素的合成是通过细胞质进入液泡并在其中积累的,但还无法确定其前体物质最初是在细胞的哪个部位或哪类细胞器中产生、转运以及如何进一步合成并积累,这些问题有待研究。

2.2.2 金丝桃素在贯叶连翘细胞与组织培养过程的积累

贯叶连翘细胞和组织培养研究起步较晚。1990

年 Kartnig 等^[20]对贯叶连翘进行了细胞悬浮培养,结果显示培养物中金丝桃素的含量只有自然植株的 1%。此后的研究主要集中在细胞悬浮培养体系的建立和改变生长环境因子以提高金丝桃素含量等方面,而关于金丝桃素在细胞培养过程中的积累研究则少有报道。

植物细胞的全能性使得贯叶连翘愈伤组织及其组培苗的成功诱导成为可能。Gadzovska 等^[21]发现,通过贯叶连翘愈伤组织诱导所得不定芽上有红色物质的积累,并证明了其中含有金丝桃素。Kirakosyan 等^[22]根据愈伤组织细胞排列的紧密程度将发育过程中出现的贯叶连翘愈伤组织分成两类,一类叫软组织(parenchyma),形成松散的愈伤组织,另一类是深绿色排列紧密的分生组织(meristematic cells),将继续发育成胚状体。他们^[22]在胚状体愈伤组织的提取液中检测到了部分类黄酮物质,但没有检测到金丝桃素类物质,而在愈伤组织细胞继续扩增到一定生物量后,细胞停止增殖,部分愈伤组织中观察到液泡聚集大量红色物质,即金丝桃素类物质。

金丝桃素是贯叶连翘的次生代谢物,在组织培养中同样需要在一定前体物质积累的基础上才能合成,它是随着愈伤组织的发育逐渐产生和积累的。宋馨^[23]利用不同激素进行贯叶连翘愈伤组织的诱导,发现愈伤组织上的红色腺点(含金丝桃素类物质)一般都在细胞进入缓慢生长或停止分裂后才出现。同时,她^[23]通过电子显微镜对不同培养阶段的贯叶连翘愈伤组织进行切片观察,发现了金丝桃素前体物质由细胞质进入液泡并在液泡中加工、累积,这与之前植物个体发育中分泌细胞团的研究结果相一致。此外,她^[23]还发现,体外培养(细胞悬浮培养或愈伤组织诱导培养)条件下金丝桃素的产生不依赖于成熟植株所出现的黑色腺点这种特殊的分泌结构,但成熟植株的个体发育和体外培养这两种条件下产生金丝桃素结构上存在差异的具体机制并不十分清楚。金丝桃素体外培养过程中的代谢路径与成熟植株的生物合成路径是否一致也未见报道。此外,金丝桃素在体外培养过程中的具体产生及后续转运机制等问题也没有得到解决。

3 展望

贯叶连翘及其主要药用成分金丝桃素由于在

治疗抑郁症、抗癌抗病毒等方面所具有广泛的应用前景而成了当今国内外研究、开发的热点。我国有丰富的野生贯叶连翘资源,但其提取物中金丝桃素等主要药用成分含量低,且遭到严重破坏,很大程度上限制了对其深入的开发和利用。通过人工化学合成和体外细胞及组织培养的方式获得金丝桃素的研究也取得了一定进展并显示了良好的发展趋势,但获得的目的产物还远未能达到产业化水平。因此,对贯叶连翘中金丝桃素代谢过程的中间产物或相关合成酶合成、积累及转运进行深入研究,必将对金丝桃素的大量合成和调控具有重要意义。笔者认为,今后除对野生的贯叶连翘及其他金丝桃属植物资源进行合理利用和开发高效的金丝桃素合成路线外,还可以在以下几方面努力:(1)筛选特异性标记物或人工合成具有放射性标记的前体物质对细胞培养或组织培养过程中金丝桃素次生代谢过程进行细胞亚细胞水平定位,进一步阐明个体发育与体外培养过程中金丝桃素产生并积累的结构差异机理和金丝桃素及其前体物质在代谢过程中的细胞内转运机制;(2)对体外培养和个体植株发育的细胞、组织形态分化与次生代谢物积累关系的机制进行研究,及培养过程中各种外界环境因素对金丝桃素产生积累的信号传导及应激机制进行深入研究,为更好调控体外培养物产生活性成分金丝桃素提供理论基础;(3)对金丝桃素合成各过程的相关基因进行分离鉴定,并通过基因操作对其合理调控,以期提高药材质量和有效成分的含量;(4)结合现代分子标记技术与HPLC,MS,GC-MS等分析技术,对相关合成酶基因、调控因子的表达及目标产物的含量进行精确测定,为今后的工业化生产调控提供理论依据。

参考文献

- [1] 孙小莉,杜杨,刘祖亮. 金丝桃素的全合成及应用[J]. 江苏化工市场七日讯, 2006, 34(6):16-19.
- [2] Wang L(王玲), Suolang S Z(索朗斯珠), Ma J Y(马俊英). Research on extract techniques for hypericin and its pharmacological effect [J]. Prog Veter Med (动物医学进展), 2005, 26(5): 32-35.(in Chinese)
- [3] Guo T(郭腾), Wu L Y(吴连勇). Latest development on hypericin research [J]. Veter Pharm Feed Addit (兽药与饲料添加剂), 2006, 11(2): 7-9.(in Chinese)
- [4] Zhao X H(赵晓虹), Zhu Y H(祝艳华), Wang W H(王雯慧), et al. Study on the antiviral activity of hypericin protein-bound complex on H₃N₂ subtype of AIV *in vitro* [J]. J Trad Chin Veter Med (中兽医医药杂志), 2006, 3: 13-15.(in Chinese)
- [5] Zhu Y H(祝艳华), Zhao X H(赵晓虹), Wang W H(王雯慧), et al. Study on the effect of hypericin protein-bound complex against H₃N₂ subtype of avian influenza virus in chicken [J]. J Trad Chin Veter Med (中兽医医药杂志), 2006, 3: 5-8.(in Chinese)
- [6] Hu Q(胡倩), Liu X H(刘晓蕙), Wang L Q(王林泉), et al. Research on pharmacological effect and clinical applications of *Hypericum perforatum* L. [J]. Trad Chin Med Res (中医研究), 2006, 7(19): 58.(in Chinese)
- [7] Editorial Committee of Chemical and Chemical Engineering Glossary (化学化工大辞典编委会). Chemical and Chemical Engineering Glossary [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003: 12012-12013.(in Chinese)
- [8] Brockmann H, Kluge F, Muxfeldt H. Total synthese des hypericins [J]. Chem Ber, 1957, 90: 20-32.
- [9] Kirakosyan A, Sirvent T M, Gibson D M, et al. The production of hypericins and hyperforin by *in vitro* cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) [J]. Biotechn Appl Biochem, 2004, 39: 71-81.
- [10] Zobayed S M A, Afreen F, Kozai T. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort [J]. Plant Physiol Biochem, 2005, 43: 977-984.
- [11] Bais H P, Vepachedu R, Lawrence C B, et al. Molecular and biochemical characterization of an enzyme responsible for the formation of hypericin in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) [J]. J Biol Chem, 2003, 278(34): 32413-32422.
- [12] Couceiro M A, Afreen F, Zobayed S M A, et al. Variation in concentrations of major bioactive compounds of St. John's wort: Effects of harvesting time, temperature and germplasm [J]. Plant Sci, 2006, 170: 128-134.
- [13] Zobayed S M A, Afreen F, Goto E, et al. Plant-environment interactions: accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum* [J]. Ann Bot, 2006, 98: 793-804.
- [14] Southwell I A, Campbell M H. Hypericin content variation in *Hypericum perforatum* in Australia [J]. Phytochemistry, 1991, 30: 475-478.
- [15] Liu W Z(刘文哲), Hu Z H(胡正海). The secretory structure of *Hypericum perforatum* and its relation to hypericin accumulation [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1999, 41(4): 369-372.(in Chinese)
- [16] Lu H F, Shen Z G, Li J Y, et al. The patterns of secretory structure and their relation to hypericin content in *Hypericum* [J]. Acta Bot Sin, 2001, 43(10): 1085-1088.
- [17] Lu H F(吕洪飞), Hu Z H(胡正海). Studies on the development of secretory structures and their secretory products accumulation of *Hypericum perforatum* [J]. Acta Bot Boreal-Occid Sin (西北植物学报), 2001, 21(2): 287-292.(in Chinese)
- [18] Liu W Z, Lu H F, Hu Z H. Ultrastructure of the multicellular nodules in *Hypericum perforatum* leaves [J]. Acta Bot Sin, 2002, 44(6): 649-656.

- [19] Onelli E, Rivetta A, Giorgi A, et al. Ultrastructural studies on the developing secretory nodules of *Hypericum perforatum* [J]. *Flora*, 2002, 197: 92–101.
- [20] Kartnig T H, Gobel I. Determination of hypericin and pseudohypericin by thin-layer chromatography — densitometry [J]. *J Chromatogr*, 1992, 609: 423–426.
- [21] Gadzovska S, Maury S, Ounnar S, et al. Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different *Hypericum perforatum* L. *in vitro* cultures [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43: 591–601.
- [22] Kirakosyan A B, Vardapetyan R R, Charchoglyan A G. The content of hypericin and pseudo-hypericin in cell cultures of *Hypericum perforatum* [J]. *Russ J Plant Physiol*, 2000, 47 (2): 270–273.
- [23] Song X(宋馨). Callus differentiation of *Hypericum perforatum* L. and the accumulation of hypericins [D]. Shanghai: Tongji University, 2006: 28–31.(in Chinese)