

Cell Culture and Biological Regulation of Triterpenoid Synthesis in Birch

白桦细胞培养与三萜合成的生物调控

詹亚光 尹 静 著



科学出版社

白桦细胞培养与三萜 合成的生物调控

詹亚光 尹 静 著



科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书在总结作者多年来的科研成果和国内外最新资料的基础上,全面系统地论述了白桦及白桦三萜代谢与合成调控的理论与技术。主要内容涉及白桦三萜分布、合成特性、药理活性,白桦三萜代谢途径,白桦细胞培养体系的优化及其三萜类物质代谢调控,白桦三萜合成与环境的关系,白桦三萜合成积累调控生理及分子机制,白桦三萜合成途径关键酶基因的克隆及遗传途径改良。

本书适用于从事林木次生代谢、天然产物开发及利用、林产化学、林学、天然产物细胞工程和基因工程利用等学科或相关专业研究生、大学本科生学习参考及有关研究部门和生产单位技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

白桦细胞培养与三萜合成的生物调控/詹亚光,尹静著. —北京:科学出版社, 2017.3

ISBN 978-7-03-052128-6

I. ①白… II. ①詹… ②尹… III. ①白桦-细胞培养-研究 ②三萜-合成-研究 IV. ①S792.153 ②0629.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 052409 号

责任编辑:张会格 韩学哲 景艳霞 / 责任校对:刘亚琦

责任印制:张 伟 / 封面设计:刘新新

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码 100717

<http://www.sciencep.com>

北京东华虎彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 3 月第 一 版 开本: 720×1000 B5

2017 年 3 月第一次印刷 印张: 14

字数: 264 000

定价: 98.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

自 Fujioka 等 (1994) 和 Pisha 等 (1995) 先后报道了白桦脂酸对人类免疫缺陷病毒 (艾滋病病毒) HIV 和黑色素肿瘤的生长的抑制作用后, 人们发现白桦三萜可高效、有选择地抑制肿瘤生长, 是优良的抗艾滋病和肿瘤的先锋药物。但因其结构复杂, 化学合成产量低, 成本高, 一直是制约其临床应用的瓶颈问题。白桦树皮中白桦脂醇含量较高 (约占树皮干重的 25%), 然而一株 30 年生白桦树大约含白桦脂醇不到 0.5kg, 而目前纯度为 95% 的白桦脂醇市场售价为 2000 元/g 左右, 真正作为药剂使用的价格更为昂贵。而剥取树皮这样掠夺式的资源利用方式不仅导致资源的枯竭, 不能永续利用, 而且含量不稳定, 生产力低。通过环境与信号调控或应用生物技术手段进行白桦脂醇高效合成, 利用植物细胞工程手段将细胞增殖和次生代谢产物诱导合成结合起来, 将有效地解决这个难题。

植物的次生代谢是植物在长期进化中与环境相互作用的结果。次生代谢产物在植物提高自身保护和生存竞争能力、协调与环境关系中充当重要的角色, 其产生和变化比初生代谢产物与环境有着更强的相关性和对应性。通过对环境因子的调控使药用植物有益的次生代谢产物含量提高, 同时探讨其最佳的植物生长条件及代谢产物的高效合成途径, 对我国天然药物开发与利用具有重要的价值。

本书作者通过十余年的不懈努力建立起白桦细胞和幼树培养中三萜高效合成技术, 并明确次生代谢产物积累规律和代谢途径的调控机制, 该项研究成果对植物次生代谢工程研究具有重要的科学意义, 同时也为生物反应器生产白桦三萜和药用白桦定向培育提供理论依据和技术支持, 具有的社会效益、经济效益和生态效益都是显著的, 应用前景十分广阔。

本书共包括 7 章: 白桦及白桦三萜, 白桦三萜含量在树体部位、种源和树龄间的变异, 白桦愈伤组织固体培养体系的优化及其三萜类物质代谢调控, 白桦愈伤组织悬浮培养体系中白桦三萜合成调控与利用, 白桦幼树中三萜合成的调控及其利用技术, 白桦细胞三萜合成积累调控机制, 白桦三萜合成途径关键酶基因的克隆及分子调控。

目前从事植物次生代谢的研究者尚需要将生物化学和细胞工程利用以及分子生物学原理等知识有机地结合, 本书及时为从事植物生物技术和次生代谢产物利用的研究者和学生提供了系统的理论知识和技术支撑, 以及研究思路的启迪。

承蒙黑龙江省自然科学基金重点项目“白桦植株三萜环境调控及关键酶基因表达研究”(ZD200918)、国家自然科学基金项目“MJ 和 NO 促进白桦悬浮细胞三萜合成的分子机制研究”(31070531) 和“b-HLH 转录因子在响应 MeJA 和 SA 诱导白

桦三萜合成中的功能及调控机制”(31570589)的资助,詹亚光教授负责主持该项研究并负责全书统稿及第二至第四章撰写,尹静副教授负责第一、第四至第七章及附录的相关研究与撰写;范桂枝副教授负责第二章和第三章的研究,参编字数1万字;曾凡锁副教授参与本书中NO信号调控相关内容的研究,参编字数1万字;由香玲教授参与白桦单细胞筛选及培养研究,参编字数0.5万字。参与的研究生有:王博、李新宇、占爱瑶、李春晓、任春林、翟俏丽、刘堃、赵微、王艳、马泓思、苏欣、梁甜、张梦岩;在此,对本研究给予帮助的刘桂丰教授、齐凤慧高级工程师表示感谢。

詹亚光
2017年1月

目 录

前言

第一章 白桦及白桦三萜	1
第一节 白桦概况	1
一、白桦分布及特性	1
二、白桦用途	1
第二节 白桦三萜	2
一、白桦三萜概述	2
二、白桦三萜种类	3
三、白桦三萜药理活性及抗病机制	3
四、白桦三萜化学改造研究	8
五、白桦三萜代谢途径	20
本章小结与展望	27
参考文献	28
第二章 白桦三萜含量在树体部位、种源和树龄间的变异	34
第一节 白桦不同部位白桦脂醇的含量分析	34
第二节 白桦种源间白桦脂醇含量的变异分析	35
第三节 不同树龄白桦中白桦脂醇和齐墩果酸含量与分布	36
本章小结	37
参考文献	37
第三章 白桦愈伤组织固体培养体系的优化及其三萜类物质代谢调控	39
第一节 不同激素配比对白桦愈伤组织诱导的影响	39
第二节 不同培养基类型对白桦愈伤组织生长及其三萜物质积累的影响	41
一、不同培养基类型对白桦愈伤组织细胞活力的影响	41
二、不同培养基类型对白桦愈伤组织鲜重积累的影响	41
三、不同培养基类型对白桦愈伤组织中三萜物质含量的影响	42
第三节 不同激素配比对白桦愈伤组织生长及其三萜物质积累的影响	43
一、不同激素配比对白桦愈伤组织细胞活力的影响	43
二、不同激素配比对白桦愈伤组织鲜重积累的影响	43
三、不同激素配比对白桦愈伤组织中三萜物质含量的影响	44

第四节 不同种类和浓度的碳源对白桦愈伤组织生长及其三萜物质积累的影响	45
一、不同种类和浓度的碳源对白桦愈伤组织细胞活力的影响	45
二、不同种类和浓度的碳源对白桦愈伤组织鲜重积累的影响	46
三、不同种类和浓度的碳源对白桦愈伤组织中三萜物质含量的影响	46
第五节 不同光处理对白桦愈伤组织生长及其三萜物质积累的影响	47
一、不同光处理对白桦愈伤组织细胞活力的影响	48
二、不同光质处理对白桦愈伤组织鲜重积累的影响	49
三、不同光质处理对白桦愈伤组织中三萜物质含量的影响	50
本章小结	51
参考文献	51
第四章 白桦愈伤组织悬浮培养体系中白桦三萜合成调控与利用	53
第一节 白桦愈伤组织悬浮培养体系建立	54
一、培养时间对白桦悬浮培养细胞活力及生长量的影响	54
二、不同形态白桦愈伤组织悬浮培养后的细胞活力及生长曲线	55
三、不同培养基种类对白桦悬浮培养细胞活力及鲜重的影响	56
四、不同激素配比对白桦悬浮培养细胞活力及生长的影响	57
五、不同接种量对白桦悬浮培养细胞活力及鲜重的影响	58
六、不同光照条件对白桦悬浮培养细胞活力及鲜重的影响	59
第二节 白桦单细胞培养体系的建立及高产三萜细胞系的筛选	60
一、白桦优良悬浮体系的筛选	60
二、白桦单细胞的分离和培养方式的筛选	60
三、单细胞培养方式的选择	61
四、单细胞的两步培养法	61
五、单细胞平板培养影响因素研究	62
六、白桦高产三萜细胞系的筛选	63
第三节 愈伤组织悬浮培养中白桦三萜合成调控	63
一、培养基和激素等因素	63
二、培养条件	65
三、诱导子对白桦三萜积累的影响	66
本章小结	81
参考文献	82
第五章 白桦幼树中三萜合成的调控及其利用技术	85
第一节 白桦幼树生长及三萜合成的环境调控	85
一、氮肥	85

二、水分	89
三、光质与光强	92
四、诱导子处理	94
第二节 利用促萌技术调控白桦三萜化合物高效合成	97
一、不同截干高度及促萌方式对白桦苗萌条产量及三萜产物合成的影响	98
二、白桦植株中三萜前体及不同三萜分支产物积累特征	100
本章小结	103
参考文献	103
第六章 白桦细胞三萜合成积累调控机制	106
第一节 离体培养细胞和组织在诱导子和胁迫条件下的调控机制	106
一、细胞活力和生长状态与三萜合成的关系	106
二、防御生理变化与三萜合成的关系	110
三、白桦三萜合成关键酶基因表达与三萜合成的关系	125
四、 Ca^{2+} 与三萜合成的关系	129
五、温度胁迫对白桦细胞三萜合成调控研究	165
六、ABA、乙烯诱导对白桦丛生苗三萜合成调控研究	166
七、外源 SA、MeJA、NO 引发内源信号分子合成	167
第二节 白桦幼树对胁迫的应答及其与三萜合成的关系	173
一、MeJA 和 SA 处理对白桦光合和抗逆生理的影响	173
二、MeJA 和 SA 处理对白桦初生和次生代谢产物积累的影响	179
三、白桦幼树三萜合成途径关键酶基因对信号分子诱导的响应	184
本章小结	187
参考文献	187
第七章 白桦三萜合成途径关键酶基因的克隆及分子调控	193
第一节 白桦三萜合成途径关键酶基因的克隆	193
一、白桦法呢基焦磷酸合酶 (FPS) 基因克隆	193
二、白桦环阿齐醇合酶 (CAS) 基因克隆	194
三、白桦新鲨烯环氧酶 (OSC) 基因克隆	195
四、白桦鲨烯合酶 (SS)、鲨烯环氧酶 (SE) 基因克隆及在酵母中的表达	195
第二节 白桦三萜合成途径遗传修饰与改造	197
一、白桦 CAS RNAi 对白桦三萜物质合成调控的影响	197
二、白桦 BpDS RNAi 对白桦三萜物质合成调控的影响	198
第三节 白桦三萜合成途径基因启动子克隆	198
一、BpSS 和 BpSE 基因启动子序列克隆	198

二、*BpSS* 和 *BpSE* 基因启动子序列分析..... 199

本章小结..... 202

参考文献..... 202

附录..... 205

一、白桦组培苗的培养及愈伤组织诱导方法 205

二、分光光度计法检测白桦总三萜含量方法 206

三、齐墩果酸和白桦脂醇的提取及高效液相色谱法检测含量 206

附图

第一章 白桦及白桦三萜

白桦 (*Betula platyphylla* Suk.) 又称为桦木, 是桦木科 (Betulaceae) 桦木属 (*Betula* Linn.) 的一种落叶乔木。白桦是喜光、耐寒、耐贫瘠的阳性树种, 具有生长快、适应性强和用途广等特点, 是我国极为重要的经济树种之一。白桦不仅是工艺材、家具材、纸浆材、单板和胶合板生产的重要原料, 而且由于树皮中含有挥发油、三萜及内酯等药效成分, 因此也具有广泛的医药用途。

第一节 白桦概况

一、白桦分布及特性

(一) 白桦分布

白桦是一个北温带的广布种, 主要分布在温带亚洲的日本、朝鲜、俄罗斯和中国。在我国主要分布在华北、东北等地区。世界上, 桦木属植物约有 100 种, 主要分布于北温带, 少数分布至北极区内。在我国白桦广泛分布于东北的大、小兴安岭和长白山, 华北的燕山、太行山, 西北的秦岭、天山、阿尔泰山, 西南的横断山脉、青藏高原。我国共有 29 个种, 6 个变种, 植物资源较为丰富 (关文彬, 1998; 何武江等, 2004)。白桦林是中国东北地区多种地带性植被的先锋类型, 也是由草原向森林演化的森林草原的过渡类型。

(二) 白桦特性

白桦树干通直, 树皮白色呈层状剥离, 小枝红褐色, 具白皮孔, 叶面油绿, 叶脉清晰, 果序下垂。为强阳性树种, 喜光、耐水湿、耐瘠薄、耐寒性强、喜微酸性土壤、生长迅速和适应性较强, 是恢复植被、保护森林水分和土壤的优良造林树种。

二、白桦用途

白桦材质优良, 是一个重要的工业用材树种, 它的纹理细致, 颜色洁白, 表面光滑度高, 是制作各种高档家具及用品的良材, 大径级白桦是单板、胶合板生产的首选, 特别是航空胶合板不可替代的原料树种。

研究表明, 白桦树汁的效益是木材效益的 5 倍, 这是因为桦树汁内含大量的

糖类、氨基酸、维生素及微量的矿质元素和芳香物质等，直接饮用清香可口，可活化机体分泌的机能，预防乙二酸化合物的沉淀，增加神经功能，对动脉硬化、脑血栓、抗疲劳、抗衰老有一定的效果；桦树汁中还含有芳香油、桦树醇、皂角苷等化合物，可治疗外伤、浮肿、湿疹、关节炎，具有去除粉刺和雀斑的功效（马合沙提等，2006）。日本带广畜产大学与运营十胜千年森林的农业生产公司共同开发来自白桦树叶提取液的化妆品已于2010年5月在日本上市，该类产品具有保湿和抗过敏功效。

树皮除提取白桦油供化妆品香料用外，还有重要的药用价值。《本草纲目》中记载，桦树皮可用于黄疸、乳痈、疥疮等疾病的治疗（李时珍，1978）。此外，在民间还用于治疗慢性痢疾、清热解毒、止咳、平喘等。近年来桦树皮的药理作用受到国内外学者的广泛关注，桦树皮化学成分复杂，药理作用多样，研究发现白桦树叶和树皮中均含有重要的五环三萜类次生代谢产物，包括羽扇豆烷结构的白桦脂醇、白桦脂酸，齐墩果烷结构的齐墩果酸，达玛烷结构的达玛烯二醇等。其中白桦脂醇和白桦脂酸及其衍生物具有抗HIV病毒及抑制多种肿瘤的作用，而齐墩果酸也具有抗菌、降脂、利胆和保肝等作用，且高效低毒。可见作为极具开发潜力的药物、化妆品和保健品，白桦资源具有广阔的应用前景。

第二节 白桦三萜

一、白桦三萜概述

萜类是由异戊二烯单元（5碳）组成的化合物，通过异戊二烯途径（又称为甲羟戊酸途径）和DXP途径合成。单萜和倍半萜是植物挥发油的主要成分，也是香料的主要成分，许多倍半萜和二萜化合物是植保素。多数三萜类（triterpenes）化合物是一类基本母核由30个碳原子组成的萜类化合物，甾类化合物和三萜的合成前体都是含30个碳原子的鲨烯，为高等萜类（韩军丽等，2007）。一些萜类成分具有重要的药用价值，如倍半萜成分青蒿素是目前治疗疟疾的最佳药物，抗癌药物紫杉醇是二萜类生物碱，存在于裸子植物红豆杉中。

三萜是由30个碳原子组成的萜类化合物，分子中有6个异戊二烯单位，通式为 $(C_5H_8)_6$ 。三萜类（triterpenes）在自然界分布广泛，有的游离存在于植物体，称为三萜皂苷元（triterpenoid sapogenins）；有的以与糖结合成苷的形式存在，称为三萜皂苷（triterpenoid saponins）。三萜类在自然界分布广泛，菌类、蕨类、单子叶、双子叶植物及动物和海洋生物中均有分布，尤以双子叶植物中分布最多。含有三萜类成分的主要中药如人参、甘草、柴胡、黄芪、桔梗、川楝皮、泽泻、灵芝等。少数三萜类成分也存在于动物体，如从羊毛脂中分离出羊毛脂醇，从鲨鱼肝脏中分离出鲨烯等。目前已发现的三萜类化合物，多数为四环三萜和五环三萜，

少数为链状、单环、双环和三环三萜。其中五环三萜类化合物又可以分为 β -香树脂醇型、 α -香树脂醇型、木栓酮型、羽扇豆醇型、何帕烷型等。

二、白桦三萜种类

桦木属中的三萜类成分主要存在于树皮（外皮）和树叶中，主要类型有香树脂醇型、达玛烷型、羽扇豆烷型和齐墩果烷型。叶中存在的三萜主要为达玛烷型，由于与人参皂苷的苷元结构相似，所以表现出一些特殊的生物活性。桦叶烯三醇（*betula folenentriol*）与人参皂苷的苷元的差别仅在于 C-3 羟基的构型不同。Fuchino 等（1996）研究的 6 种白桦中，*B. platyphylla* var. *japonica* 叶中具有 3α 、 12β -羟基的达玛烷型三萜，并可形成丙二酸酯，而 *B. errmanii* 叶中具有 3β 、 11α -羟基达玛烷型三萜，并形成葡萄糖苷。在 *B. platyphylla* var. *japonica* 中，达玛烷型三萜存在于叶和根皮，树干部的树皮中则没有；叶中的达玛烷型三萜具有 3α 、 12β -羟基，而树皮中则只有 3β -羟基，缺少 12-羟基。*B. maximowiczii* 中主要含有 3α 、 12α 、 20 -羟基达玛烷型三萜，*B. davurica* 中的达玛烷型三萜为 3α 、 17β 、 20 -羟基；*B. schmidtii* 中含有开环三萜。说明，不同白桦树种叶中的三萜类物质存在差异，且叶中主要是达玛烷型三萜，而羽扇豆烷型（白桦脂醇）含量较少。而白桦中羽扇豆烷型白桦脂醇、白桦脂酸和齐墩果烷型齐墩果酸三萜主要分布在白桦树外皮中。

三、白桦三萜药理活性及抗病机制

（一）白桦三萜的医药价值

近年来，白桦脂醇及其衍生物的药理作用受到国内外学者的广泛重视，桦树皮化学成分复杂，药理作用多样，其提取物具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、降脂、利胆和保肝等作用（毕毅等，2005）。研究表明大多数五元环三萜类化合物都具有抗炎性质，其中包括白桦脂酸和白桦脂醇，这两个化合物已在大量的体外和体内模型体系中得到验证。早在 1959 年，白桦脂酸即被发现有抗炎的作用。研究结果表明白桦脂酸和白桦脂醇都是在较高浓度下具有温和的抗炎性，而且它们的抗炎性要归因于对非神经基因路径的抑制。近年来的相关报道指出白桦脂酸及其衍生物有抗 G^+ 菌的活性，如葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、芽孢杆菌属（*Bacillus*），而对 G^- ，如大肠杆菌（*Escherichia coli*）未发现有抑制作用。

（二）白桦三萜抗病机制

1. 抗 HIV 病毒

获得性免疫缺陷综合征（acquired immunodeficiency syndrome, AIDS，艾滋病）是由人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus, HIV）感染引起的，

以全身免疫系统严重损害为特征的传染性疾病(王茜等, 2003), 被视为“超级癌症”和“世纪瘟疫”。

长期以来科学家们一直致力于抗 HIV 药物的研究。目前已有 14 种化合物用于 HIV 感染的治疗, 其中 6 种为核苷逆转录酶抑制剂(NRTI), 它们进入细胞后转化成为 5-三磷酸, 作为正常底物(DNTP)的竞争性抑制剂而起作用; 3 种为非核苷逆转录酶抑制剂(NNRTI), 它们在非底物结合的变构部位直接抑制逆转录酶; 其余 5 种为 HIV 蛋白酶抑制剂(PI), 它们能阻止前体分裂为成熟的 HIV 蛋白, 从而削弱病毒颗粒的感染性。所有的 NRTI、NNRTI 及 PI 都是化学合成物质, 无一来自天然产物, 且这些药物在临床应用中逐渐暴露出许多局限性, 尤其是毒副作用和耐药性(衣淑珍, 1999)。目前开发新型的抗 HIV 药物主要集中于发现具有新型结构和新型作用机制的各种化合物(肖苏龙等, 2015)。近年来发现, 许多五环三萜类化合物显示出了较好的抗 HIV 活性, 可作用于 HIV 生命周期的多个步骤, 如病毒进入、逆转录、组装和成熟等。美国北卡罗来纳大学 Lee 课题组在这一领域做了非常多的研究工作, 成功发现了以 Bevirimat 为代表的一系列抗 HIV 活性强而毒性低的五环三萜衍生物。

白桦脂醇、白桦脂酸及其衍生物作为生物制剂在 HIV 和癌症治疗方面表现出巨大的潜能。1994 年, Fujioka 等首先提出白桦脂酸可抑制 H9 淋巴细胞中 HIV 的复制, 并且 C-3, C-17, C-19 等位取代的衍生物也有同样的作用, 有的甚至更强, 对其他白桦脂酸和白桦脂醇同系物也进行了抗 HIV-1 活性研究。研究表明, 尽管这些化合物不抑制 HIV-1 逆转录酶, 但它们在浓度高于 IC_{50} 值时会抑制合胞体的形成。从而可以断定这些白桦脂酸和白桦脂醇的衍生物是通过干扰病毒生命循环的后阶段来起作用的, 是与病毒进入和成长成熟相关的。有研究认为在白桦树皮中的强力抗 HIV 活性化合物 PA-457, 是以白桦脂酸为先导化合物的抗 HIV 药物, 与已有的 AIDS 治疗药的作用机制完全不同, 美国 2003 年 12 月开始进行临床试验。由于白桦脂醇具有与白桦脂酸相同的羽扇豆烷骨架, 而且白桦树皮中含量较多。因此, 以白桦脂醇为先导化合物进行抗 HIV 药物筛选。通过实验: 制备白桦脂醇及二氢白桦脂醇的各种 3-O-单乙酰基衍生物, 探讨了其抗 HIV 活性。3-O-戊二酰基-二氢白桦脂醇的 EC_{50} 为 $2 \times 10^{-5} \mu\text{mol/L}$, TI 为 1.12×10^6 , 与 PA-45 ($EC_{50} < 0.00035 \mu\text{mol/L}$, TI > 20000) 比较显示极强的抗 HIV 活性。并且, 类似的二氢白桦脂醇衍生物亦具有强的抗 HIV 活性 (EC_{50} 为 $0.0013 \sim 0.0017 \mu\text{mol/L}$ 、TI 为 $16000 \sim 19000$)。与此相反, 3-O-单乙酰基-白桦脂醇衍生物的抗 HIV 活性则弱于二氢白桦脂醇衍生物。上述结果提示, 白桦树皮的主要成分白桦脂醇可衍生强力的抗 HIV 药, 可作为药用资源使用。在抗 HIV 领域, 目前已经有 14 种化合物用于 HIV 感染研究。其中, 6 种为核苷逆转录酶的抑制剂, 3 种为非核苷逆转录抑制剂, 5 种为 HIV 蛋白酶抑制剂。这些药物都是化学合成物质, 无一来自天然产物。开发出简单易得、副作用小、作用持久的抗肿瘤药物, 是目前关注的重点。

Fujioka 等 (1994) 首先提出白桦脂酸可抑制 H9 淋巴细胞中 HIV 的复制, 并且 C-3、C-17、C-19 等位取代的衍生物也有同样的作用, 有的甚至更强, 而它们所引起的抗 HIV 活性与对 PKC (蛋白激酶 C) 的抑制无关。另有报道, 白桦脂酸阻止 HIV 与细胞的结合过程而使其难以进入细胞, 并且抑制了 DNA 聚合酶活性, 还可能影响了病毒复制过程中的组装步骤 (Taisei et al., 2001; Soler et al., 1996), 但尚不清楚对 HIV 的抑制是否有 APN 的参与 (Melzig and Bonnannh, 1998)。后来的许多研究也都表明白桦脂酸是植物天然产物中具有抗 HIV 活性较高的物质。美国 Marc Pharmaceuticals 公司通过研究人员完成的细胞实验数据表明, 白桦脂醇的一种新衍生物, 可以 90% 抑制 HIV-1 复制, 并且未观察到对细胞活性有任何毒副作用。这为研制开发 HIV 药物的进一步临床前实验提供了铺垫。之前美国马里兰州的一家公司 Panacos 于 2005 年 5 月完成了抑制 HIV 的 PA-457 研究, 也是白桦脂醇的衍生物。PA-457 是白桦脂醇-3-葡萄糖皂苷, 它对成熟的 HIV 病毒有较高的抑制作用。由于病毒成熟而变得有感染性, Gag 蛋白通过病毒蛋白酶被分解成几个蛋白, 包括衣壳、核衣壳和基质。PA-457 通过阻断 Gag 蛋白加工过程中最后的特殊步骤起作用, 从而阻止衣壳的释放。没有衣壳, 病毒就存在缺陷, 就不可能扩散并引起疾病流行。另外也有研究证明白桦脂醇能够抑制 HIV 的 gp41 侵染 T 细胞, gp41 是一种 HIV 蛋白, 它可使病毒侵染细胞。

从桃金娘科蒲桃属植物 *Syzygium claviflorum* 中分离得到的白桦脂酸也具有显著的抗 HIV 活性。这是两个最早被确认为具有抗 HIV 活性的羽扇豆烷型三萜类化合物。其中白桦脂酸抑制 H9 淋巴细胞中 HIV 的复制, EC_{50} 为 $114\mu\text{mol/L}$; 抑制未被感染的 H9 细胞生长, 是 HIV 与细胞膜的融合抑制剂。

2. 抗肿瘤活性

恶性肿瘤是一种严重威胁人类健康的疾病, 其死亡率居所有疾病死亡率的第二位, 仅次于心脑血管疾病。抗肿瘤的天然药物喜树碱、鬼臼毒素、长春碱和紫杉醇以及它们的一些衍生物是最重要的癌症治疗药物的一部分, 可通过作用于不同的亚细胞的靶点和激活独特的信号通道触发凋亡。在长期的应用中, 抗癌药物同样出现了毒副作用和耐药性的问题。开发新型的抗肿瘤药物是药学工作者面临的紧迫任务 (彭司勋, 2002)。

Pisha 等 (1995) 报道了白桦脂酸可以选择性地抑制黑色素瘤细胞的生长。随着对白桦脂酸进一步的深入研究发现它是启动细胞的程序性死亡, 即细胞凋亡 (apoptosis) 来发挥其抗肿瘤效应的, 这种诱导可能是直接作用于细胞的线粒体而不依赖 p53 蛋白的积累, 也不依赖凋亡诱导受体系统 CD95 (Fulda et al., 1999; Valentina et al., 2002)。如果白桦脂酸抑瘤的机制确是如此, 那它与传统的细胞毒药物是不同的。2002 年, Chowdhry 等首次提出白桦脂酸抑制真核细胞生物的拓扑异构酶 I, 并确定了抑制反应的步骤和白桦脂酸不同碳位修饰后衍生物的情况,

认为可以用白桦脂酸进行抗肿瘤药物的设计。Chou 等 (2000) 还研究了白桦脂酸对 MDCK (madin darby canine kidney) 细胞内 Ca^{2+} 水平的影响, 这也是引起发生各种细胞功能改变的因素, 还有研究表明白桦脂酸抑制了肿瘤细胞生长时所需的关键酶 (WO95/04526)。除黑色素瘤细胞外, 受白桦脂酸抑制的还有儿童恶性脑瘤细胞, 多种神经瘤细胞和肉瘤细胞等 (Valentina et al., 2002)。叶银英等 (2000, 2001) 研究 23-羟基白桦脂酸对体内、外 B16 黑色素瘤细胞生长的抑制及诱导凋亡作用。应用 MTT 分析、电镜观察、流式细胞仪、肿瘤体积大小测定等方法, 对 23-羟基白桦脂酸诱导黑色素瘤细胞进行检测和观察。结果发现它们对黑色素瘤和其他 7 种恶性肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用, 并呈现出一定的剂量依赖关系, 细胞生长周期被阻滞, 最终导致了大量的细胞凋亡。高剂量白桦脂酸处理的细胞 6h 就开始启动凋亡程序, 24h 内的某一瞬间即完成了全过程。此外, 他们还发现了低剂量白桦脂酸的诱导分化作用, 这也拓宽了白桦脂酸的临床应用领域。Pisha 等 (1995) 研究了环境温度和 pH 对白桦脂酸作用的影响, 认为在低 pH 环境中, 黑色素瘤细胞对白桦脂酸则表现得更为敏感, 即可引起更高水平的凋亡和细胞毒作用。也有研究认为, 白桦脂酸能够提高 T 细胞的增殖力, 促进 NK 细胞的活性, 提高 TNF 水平及增加 IL-2 的生成, 因此, 其抑瘤机制可能与其直接或间接地增强机体抗肿瘤免疫功能有关 (韩淑英等, 2002)。Melzig 和 Bonnannh (1998) 提出白桦脂酸是 APN (氨肽酶 N) 的抑制剂, 因而能抑制肿瘤细胞的侵袭, 并启动凋亡。白桦脂酸抗肿瘤作用的特异性越来越受到关注, 即它对黑色素瘤细胞的抑制和凋亡诱导作用远远高于胃癌、肝癌等其他细胞, 因而可以将白桦脂酸用作特异性的细胞凋亡诱导剂 (Emily et al., 1995; 李岩等, 2001)。李薇等 (2000) 研究白桦三萜类 (triterpenes isolated from *Betula platyphylla*, TBP) 物质体内抗肿瘤作用及其对荷瘤小鼠免疫功能的影响。利用小鼠体内移植瘤模型, 测定 TBP 对小鼠黑色素瘤 B16、肉瘤 S180、Lewis 肺癌和艾氏腹水癌等肿瘤的抑瘤率。采用放射性掺入法检测 ConA 诱导的脾细胞增殖反应, 放射性释放法检测巨噬细胞毒活性, 中性红释放法检测 TNF 和 NK 细胞活性。结果表明, TBP 对各瘤株的抑瘤率均达到 30% 以上, 对黑色素瘤 B16 的效果最好, 抑瘤率为 51.14%。TBP 对 ConA 诱导的增殖反应对 NK 细胞活性无明显影响, 但可促进巨噬细胞和脾细胞分泌 TNF, 增加巨噬细胞的细胞毒活性。明确 TBP 具有良好的抗肿瘤作用, 增强机体的非特异性免疫功能是其抗肿瘤机制之一。肿瘤坏死因子 (TNF) 是一种多功能细胞因子, 可以通过直接杀伤肿瘤细胞、诱导细胞凋亡和介导免疫应答等途径起到抗肿瘤作用。TNF 在体外或体内局部用药时抑瘤作用较强, 用药物诱导机体巨噬细胞, 特别是肿瘤细胞中处于一定程度激活状态的巨噬细胞及其他免疫细胞产生内源性 TNF 是肿瘤药物治疗中值得重视的途径。TBP 在这方面显示了良好的开发前景。用不同剂量的白桦脂醇作用于 EC109 食管癌细胞 48h, 噻唑蓝 (methyl thiazole tetrazolium, MTT) 法检测细胞抑制率。结果表明, 白桦脂醇

作用于食管癌细胞 EC109 后, EC109 细胞形态发生明显改变, 细胞抑制率随白桦脂醇浓度的增高而增高, 呈现剂量依赖关系, 发现白桦脂醇对食管癌细胞 EC109 有明显抑制活性。有报道认为白桦脂酸诱导细胞凋亡是非依赖的, 白桦脂酸诱导神经外胚层系统肿瘤细胞凋亡时, 有 caspase 的激活, 但与 p53 无关。诱导细胞凋亡是其抗肿瘤机制之一。TBP 还可使肿瘤细胞生长阻断于 G_0/G_1 期, 细胞向 S 期移行受阻, 从而抑制肿瘤生长。推测 TBP 中白桦脂酸在 TBP 诱导细胞凋亡过程中起重要作用, TBP 抗肿瘤作用的发现, 为新抗肿瘤药物的发现提供了一个先导化合物的基本结构。

周尧远等 (2006) 探讨 23-羟基白桦酸 (23-HBA) 对血管内皮细胞 (ECV-304) 形态变化、增殖和迁移的影响。结果认为, 23-HBA 对 ECV-304 细胞的 IC_{50} 为 $39.74\mu\text{g/ml}$ 。当 23-HBA 浓度提高到 $20\mu\text{g/ml}$ 以上, ECV-304 细胞的凋亡现象非常明显。23-HBA 浓度在 $1\mu\text{g/ml}$ 时即能抑制细胞的迁移, 并呈明显的剂量依赖性。另外还认为, 23-HBA 有可能成为一个有较好前景的抑制血管瘤形成的药物。23-HBA 是一种从白头翁中提取的三萜类的化合物, 研究证实, 23-HBA 具有抗 HIV-1 和抗肿瘤等生物活性, 有实验证明在体外对人宫颈癌 HeLa 细胞系、神经外胚层肿瘤、黑色素瘤 B16 细胞系等的活性抑制非常显著, 能导致细胞凋亡。它是一种通过直接作用于线粒体而触发凋亡的 proapoptotic 型细胞毒剂。在细胞游离系统中, 经白桦脂酸诱导通透性转变的线粒体能通过释放可溶性因子等方式介导 caspase-8 和 caspase-3 的激活 (叶文才等, 1990)。

3. 抗菌等其他药理活性

对白桦的化学成分研究表明, 白桦皮内含有多种化合物, 其中多酚类成分有阿魏酸、木质素、儿茶素和表儿茶素等 (崔艳霞和郑志方, 1994); 白桦叶中含有黄酮类、三萜皂苷类和酚酸类物质, 其中酚类物质有对二苯酚、邻二苯酚、对羟基苯甲醛、没食子酸等。《本草纲目》中记载, 桦树皮可用于黄疸、乳痈、疥疮等疾病的治疗。早在 1959 年, 白桦脂酸即被发现有抗炎的作用, 近年来的相关报道指出白桦脂酸及其衍生物有抗 G^+ 菌的活性。刘志芹 (2004) 对白桦皮和白桦叶的提取物进行抗真菌试验, 测定其最小抑菌浓度 (MIC) 值。结果表明, 测得白桦皮和白桦叶提取物对真菌中不同菌种的 MIC 值分别为 $0.313\sim 1.100\text{mg/g}$ 和 $0.625\sim 1.100\text{mg/g}$ 。认为白桦皮和白桦叶提取物具有显著的抗真菌作用。所以, 桦木三萜类化合物 (TBP) 不仅可以作为抗肿瘤和抗 HIV 药物, 它还具有抗病毒、抗菌、保肝护肝的活性, 可治疗慢性气管炎、慢性痢疾等。此外, 白桦脂酸及其衍生物还有镇咳祛痰、清热利湿、消肿解毒、提高机体免疫力、降血脂等作用 (Schuhly et al., 1999; Steele et al., 1999; 王建华等, 1994)。

国外对桦木属植物的研究深入而广泛, 以欧洲和日本为最早。在桦木属植物中, 以对欧洲白桦 (*B. pendula* Roth) 和银桦 (*B. pubescens*) 的研究最多。在日本,

白桦提取物多用于制作化妆品。我国学者对白桦树液初步分析结果表明, 含有 0.8% 葡萄糖, 0.55% 果糖, 少量的氨基酸, 62.4 $\mu\text{g/ml}$ 钙, 11.47 $\mu\text{g/ml}$ 镁, 0.492 $\mu\text{g/ml}$ 锌, 0.485 $\mu\text{g/ml}$ 锰等 20 余种无机元素, 还有木糖醇。桦树汁具有很高的营养价值, 不仅喝起来十分爽口, 而且具有较好的药理作用。丰富的钙、镁对软骨病、头痛、肌肉痉挛有较好疗效; 适量的锌可促进人体发育; 木糖醇可以治疗糖尿病。另外, 它对白喉、结核、伤寒、痢疾等病菌具有显著的杀伤作用。可见, 桦木三萜将在食品、日化、生物制品、医药等领域发挥重要作用。

四、白桦三萜化学改造研究

(一) 白桦脂醇化学结构与理化特性

白桦脂醇 (betulin; betulinol, lup-20 (29)-ene-3 β , 28-diol) 又称为桦木脑、桦木素和桦木醇。分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$, 整体分子结构保持了羽扇豆烷的结构 (图 1-1)。溶于乙醇、乙醚、氯仿和苯, 微溶于冷水、石油醚等。在乙醇或甲醇中易结成细小的针状结晶, 熔点 257~259 $^{\circ}\text{C}$, 也可在乙酸中形成白色结晶, 熔点 238 $^{\circ}\text{C}$, 旋光度 $[\alpha]_{\text{D}}^{15} + 20^{\circ}$ ($c=2$, 吡啶), 1 份白桦脂醇分别溶于 149 份乙醇、251 份乙醚、113 份氯仿、417 份苯。含 1mol 乙醇的溶剂化物为针状结晶, 干燥后, 170~180 $^{\circ}\text{C}$ (10.67Pa) 升华。类似白桦脂醇的三萜类化合物在自然界中有广泛的资源分布, 这类化合物极性小, 在水中溶解度很小, 而易溶于极性较低的溶剂, 如二氯甲烷、乙醚等。从化学结构看, 白桦脂醇是异戊二烯的聚合物, 化合物生源途径中最关键的前体物是甲戊二羟酸, 而不是异戊二烯。因此, 白桦脂醇是甲戊二羟酸的衍生物。

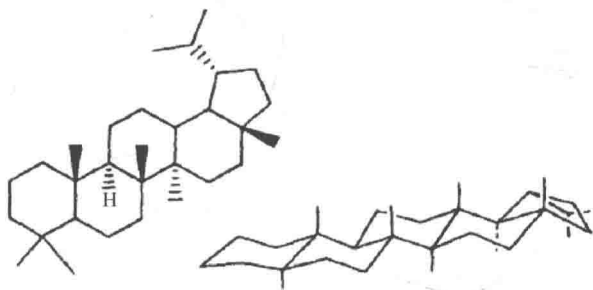


图 1-1 羽扇豆烷的结构

天然白桦脂醇 C-3 位上的羟基主要为 β -OH, 这可能是其具有较高生物活性的原因之一。它可以转变成白桦脂酸, 而白桦脂酸在生物学上比白桦脂醇本身有更高的活性。白桦脂酸 (betulinic acid) 的整体分子结构与白桦脂醇一样保持了羽扇豆烷的结构, 白桦脂酸 C-3 位上的羟基为 β -OH, 28 位为羧基, 天然白桦脂酸