



喜树幼株的喜树碱研究

XISHU YOUNG PLANT XISHUJIAN RESEARCH

王 洋 阎秀峰 著

东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

喜树幼株的喜树碱研究/王洋, 阎秀峰著. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2006.5

ISBN 7-81076-867-0

I . 喜… II . ①王… ②阎… III . 喜树碱—研究 IV . R979.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 046553 号

责任编辑: 倪乃华

封面设计: 彭 宇



NEFUP

喜树幼株的喜树碱研究

Xishu Youzhu De Xishujian Yanjiu

王 洋 阎秀峰 著

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

黑龙江省教育厅印刷厂印装

开本 850 × 1168 1/32 印张 5 字数 123 千字

2006 年 5 月第 1 版 2006 年 5 月第 1 次印刷

印数 1—1 000 册

ISBN 7-81076-867-0

Q·128 定价: 15.00 元



作者简介

王洋，1971年5月生。东北师范大学学士，黑龙江大学硕士，东北林业大学博士，美国德克萨斯州立大学医学院博士后。现为东北林业大学生命科学学院副教授，硕士生导师。曾在美国 Stehlin Foundation for Cancer Research、休斯敦大学药学系开展合作研究。



作者简介

阎秀峰，1965年3月生。哈尔滨师范大学学士，东北师范大学硕士，东北林业大学博士，日本东京大学博士后。现为东北林业大学生命科学学院教授、博士生导师、细胞生物学科带头人，中国植物生理学会理事、黑龙江省植物生理学会理事长。曾获“教育部新世纪优秀人才支持计划”、“黑龙江省杰出青年科学基金”、“东北林业大学学术名师资助计划”等人才基金资助，享受国务院政府特殊津贴。



目 录

1 喜树与喜树碱	(1)
1.1 植物次生代谢及其产物	(1)
1.2 喜 树	(7)
1.3 喜树碱	(12)
2 喜树碱和 10 - 羟基喜树碱的检测方法	(21)
2.1 喜树碱含量的高效液相色谱分析	(22)
2.2 喜树碱和 10 - 羟基喜树碱含量的同时测定	(30)
2.3 小 结	(35)
3 喜树种子萌发的喜树碱动态	(36)
3.1 未萌发喜树种子中喜树碱含量的变化	(37)
3.2 种子萌发后喜树幼苗中喜树碱含量的变化	(40)
3.3 小 结	(49)
4 喜树幼株的喜树碱分布格局	(50)
4.1 喜树幼苗(一年生)的喜树碱分布	(50)
4.2 喜树幼树(五年生)叶片和枝条的生长特性	(54)
4.3 喜树幼树(五年生)的喜树碱分布	(62)
4.4 喜树幼树(五年生)的喜树碱积累	(77)
4.5 小 结	(90)
5 喜树碱含量的季节动态和气候响应	(91)
5.1 喜树碱含量的季节变化	(92)
5.2 喜树碱含量的气候响应	(94)
5.3 小 结	(104)

6 种群密度与喜树碱含量	(105)
6.1 温室栽培实验	(105)
6.2 田间栽培实验	(128)
6.3 小 结	(143)
参考文献	(144)

1 喜树与喜树碱

喜树 (*Camptotheca acuminata* Decaisne) 是我国特有的多年生亚热带落叶阔叶树种, 因其次生代谢产物喜树碱 (Camptothecin, CPT) 具有良好的抗肿瘤活性而受到广泛关注 (阎秀峰等, 2001)。除喜树碱外, 喜树中还含有 10 - 羟基喜树碱、10 - 甲氧基喜树碱、脱氧喜树碱、喜果甙、鞣花酸类化合物、 β -谷甾醇、白桦脂酸、黄酮类化合物、 α -亚麻酸等多种次生代谢产物 (林隆泽等, 1977; 徐任生等, 1977; 毛燕等, 2002; 殷丽君等, 2003)。

1.1 植物次生代谢及其产物

植物的次生代谢是相对于初生代谢或称基本代谢而言的, 这个概念最早是由 Kössel 于 1891 年明确提出的。与维持细胞生命活动所必需的初生代谢产物不同, 次生代谢产物 (也称次生产物、次生物质) 是指植物中一大类对于细胞生命活动或植物生长发育正常进行并非必需的小分子有机化合物, 这些在植物体内含量不等的化合物均有自己独特的代谢途径, 通常由初生代谢派生而来 (陈晓亚, 1998)。

1.1.1 植物次生代谢产物分类

植物次生代谢产物的种类非常繁多, 包括醌类、黄酮类、香豆素、木质素、环氧化物、生物碱、糖苷、大环内酯、萘、萜类、甾类、皂甙、多肽类、多烯类、多炔类、有机酸、毒素和色

素等。它们的化学结构差异很大，一般可分为酚类化合物（芳香族）、萜类化合物、含氮化合物（生物碱）三大类。

1.1.1.1 酚类化合物

酚类化合物是芳香族环上的氢原子被羟基或功能衍生物取代后生成的次生代谢产物，种类繁多。有些只溶于有机溶剂，有些是水溶性羧酸和糖苷，有些是不溶的大分子多聚体，又可分为苯丙烷类、醌类、黄酮类、鞣质几个大的亚类。

1.1.1.2 萜类化合物

萜类化合物在植物界中广泛存在，由2到多个异戊二烯单元聚合而成，有链状的，也有环状的，一般不溶于水。萜类又依异戊二烯的数目而有单萜、倍半萜、双萜、三萜、四萜和多萜之分。

1.1.1.3 含氮化合物

含氮化合物在植物次生代谢产物中种类很多，主要是以普通的氨基酸为前体合成的，主要包括生物碱、含氰苷、芥子油苷、非蛋白氨基酸等几个大的亚类。

1.1.2 植物次生代谢的特点

植物次生代谢过程复杂而多变，相同的产物可能来源于不同的次生代谢过程。例如，吲哚乙酸的生物合成目前就认为可能有四种不同的途径：①吲哚丙酮酸（Indole - 3 - pyruvate）途径；②吲哚乙醛肟（Indole - 3 - acetaldoxime, IAN）途径；③色胺（Tryptamine）途径；④区别于以上三种途径的非色氨酸途径。此外，不同的产物也可能来源于相近或相类的次生代谢过程。

许多次生代谢产物的生物合成是由不同的中间产物缩合形成的，而这些中间产物又往往来源于不同的次生代谢途径，这也是植物次生代谢过程复杂多变性的又一明显特征。同时，另一些次生代谢产物的合成则是在形成母体次生代谢产物的基础上经过脱氢、甲基化、氧化等加成反应而形成一系列结构性质极为相似的

同类化合物。

植物次生代谢的另一个特点就是不仅具有种属特异性，而且具有明显的细胞、组织、器官及发育期特异性，特定种类的次生代谢产物在植物体内也不是普遍存在，而是限制在一些特定的细胞、组织、器官或是特定的发育时期。例如，烟草 (*Nicotiana tabacum*) 和莨菪 (*Atropa belladonna*) 的生物碱主要在根部合成，然后运输到叶肉细胞中储存。金鸡纳属 (*Cinchona*) 的奎宁和奎宁丁只存在于树皮中。辣椒 (*Capsicum annuum*) 中的辣椒素只有在生殖生长的后期才能在果皮中合成并积累。番红花 (*Crocus sativus*) 中的色素成分主要存在于花柱和柱头中；罂粟 (*Papaver somniferum*) 和长春花 (*Catharanthus roseus*) 的生物碱储存在乳汁管或特化的薄壁组织细胞中等等（阎秀峰，2001）。

1.1.3 植物次生代谢的作用及其与环境的关系

研究表明，植物次生代谢产物在植物中主要承担着化学防御的任务，即植物为防止和抵御外来侵害而通过次生代谢过程合成各种具有防御作用的次生代谢产物，以保护自身不受或少受损伤。这种化学防御既包括植物对非生物的环境因子胁迫的适应性反应，对食草动物、昆虫取食以及对病原微生物侵害的防御性反应，亦包括植物在争夺自然资源的竞争中对他种或同种植物生长的化感作用。

防御外界伤害的能力对于生物的存活和发展至关重要。面对环境胁迫可能造成的伤害，植物尽管不能像动物那样具备主动驱避行为，但在其进化过程中也建立了一整套防御体系。植物的防御体系大体上可分为物理防御和化学防御两大部分。物理防御表现为植物在进化过程中形成的特有的形态结构，如抵御干旱的保水结构、抵御采食的刺状器官以及抵御昆虫的伪装器官等等。次生代谢产物是植物在长期进化中与环境（生物的和非生物的）相

互作用的结果，充当化学防御角色的次生代谢产物在植物提高自身保护和生存竞争能力、协调与环境关系上发挥着重要的作用，与环境有着较强的相关性和对应性，是植物面对各种恶劣环境时增强自我保护能力的一种重要手段。

在干旱胁迫下，植物组织中次生代谢产物的浓度常常上升，包括生氰苷、其他硫化物、萜类化合物、生物碱、单宁和有机酸 (Gershenson, 1984; Haack, et al, 1987; 宋君等, 1990)。对某些耐旱植物的研究发现，其体内的脱落酸和脯氨酸含量较高。例如，小麦在发生萎蔫的4 h 内，脱落酸含量即增加40倍；在大麦的不同抗旱性品系中，抗性的强弱与其体内脯氨酸含量高低具有很高的相关性 (杜近义等, 1999)。万寿菊在水分胁迫条件下 (干旱)，其酚类物质的含量明显高于其在水分充足时的含量 (Tang, et al, 1995)。Hall 等人 (1982) 研究发现，随着营养胁迫程度的增强，向日葵产生的酚类物质含量相应增加。淡土植物和盐生植物由非盐条件逐步转移至高盐分环境中都能诱导脯氨酸生成量的逐步增加。在营养缺乏条件下生长的植物中将产生大量的萜烯。

增加乙烯和乙烷的释放量是植物对大气污染危害的普遍反应，对紫花苜蓿、大豆、西红柿、落叶松、欧洲赤松和挪威云杉等的研究都得出了这一相同的结论 (Peiser, et al, 1979; Bucher, et al, 1981; Rodecap, et al, 1986)。

光强、光质和日照长短都对植物次生代谢产物有影响。植物中酚类物质的浓度会随着光强的变化而变化。森林中的植株，其上部阳生叶中酚类物质含量要比下部阴生叶中多 (Rosenthal, 1982)。同样在非洲热带雨林中，植物中的酚含量与植物受到的光照强度呈正相关。上层树种中化感物质要比下层灌木中多。生长在大棚中的欧洲赤松与大田中的相比 (其他条件相同)，树脂油和单萜类物质含量较低，主要原因是大棚中的光照强度要比棚

外低 (Heyworth, et al, 1998)。在温室中对烟草补加紫外光照射时, 其绿原酸含量增加到对照的 5 倍。受红光照射时则产生较多的生物碱、较少的酚 (宋君等, 1990)。在高温季节, 其释放的单萜明显高于其他季节。在对胜红蓟化感作用的研究中发现, 在缺肥、缺水等逆境下, 胜红蓟的体内早熟素Ⅱ 的含量增加 (孔垂华等, 1997)。

植物生长发育过程中, 除了经受非生物环境的突然变故外, 还要经受病原微生物、植食性昆虫以及其他侵占性植物的侵扰, 而病原微生物和植食性昆虫的侵袭往往是致命的。因此, 病虫害诱导的植物抗性以及植物与草食动物的协同进化近年来成为人们研究的热点问题。人们发现, 在植物对病虫害的防御机制中, 最重要的是化学因素, 其次才是物理因素 (钦俊德, 1987)。有研究表明, 萜烯类物质的产生主要与植物受到微生物的侵害有关, 该类物质能够抵御微生物的进攻 (薛应龙等, 1998)。许多研究也表明, 植物在受虫害损伤后, 在次生代谢方面一个最明显的变化是酚类化合物含量的增加 (Brant, et al, 1993)。此外, 在虫害诱导植物产生的挥发物中, 萜烯类物质是最主要的组成部分 (Dicke, 1994)。

1.1.4 植物次生代谢产物合成的诱导机理

在次生代谢产物随环境条件变化的生理机制方面, 目前已经提出了一些有意义的假说, 用这些假说可以在一定程度上来认识各种环境条件下次生代谢产物产生和释放的诱导机制 (孔垂华, 2000)。

1.1.4.1 碳素/营养平衡 (Carbon/Nutrient Balance, CNB) 假说

CNB 假说认为, 植物体内的次生代谢产物 (如酚类、萜烯类和其他一些仅以 C、H、O 为主要结构的化合物) 与植物体内的 C/N (碳素/营养) 值呈正相关, 而以 N 为基础的

次生代谢产物（如生物碱等含 N 化合物）与植物体内 C/N 值呈负相关 (Bryant, et al, 1983)。该假说建立在植物营养对植物生长的影响大于其对光合作用影响的理论基础之上。在营养胁迫时，植物生长的速度大为减慢，与之相比，光合作用变化不大，植物会积累较多 C、H 元素，体内 C/N 值增大，因此，酚类、萜烯类等以 C 为基础的次生代谢产物就会增多。然而，在遮荫条件下，光合作用降低，植物体内 C/N 值降低，导致酚类、萜烯类等不含 N 次生代谢产物数量降低。

1.1.4.2 生长/分化平衡 (Growth/Differentiation Balance, GDB) 假说

植物的生长发育从细胞水平上可分为生长和分化两个过程。前者主要包括细胞的分裂和增大，后者主要包括细胞的特化和成熟。次生代谢产物是细胞特化和成熟过程中生理活动的产物 (Wareing, et al, 1981)。GDB 假说认为，在资源充足的情况下，植物以生长为主，而在资源匮乏的情况下，植物以分化为主 (Herms, et al, 1992; Lerdau, et al, 1994; Stout, et al, 1998)，该假说与 CNB 假说具有相同的理论基础。但它比 CNB 假说的内容更为广泛。GDB 假说认为，任何对植物生长影响超过对植物光合作用影响的环境因子，都会导致次生代谢产物的增多（如营养匮乏、低温、 CO_2 浓度升高等）。GDB 假说和 CNB 假说均认为次生代谢产物的产生是不会以减少植物生长为代价的。

1.1.4.3 最佳防御 (Optimum Defense, OD) 假说

植物次生代谢产物的产生是以减少植物生长为“机会成本”的。OD 假说认为，植物只有在其产生的次生代谢产物所获得的防御收益大于其生长所获得的收益时才产生次生代谢产物 (Bazzaz, et al, 1987; Chapin, et al, 1987)。在环境胁迫条件下，植物生长减慢，此时，产生次生代谢产物的成本较低。同时，植物受损害的补偿能力较差，次生代谢产物的防御收益增加。因此，在环境胁迫条件下，植物会产生较多的次生代谢产物。

1.1.4.4 资源获得 (Resource Availability, RA) 假说

所有植物的生长发育都依赖于光、水、营养等必需资源的获得。RA 假说认为, 由于自然选择的结果, 在环境恶劣的自然条件下生长的植物, 具有生长慢而次生代谢产物多的特点; 而在良好自然条件下生长的植物, 其生长较快且次生代谢产物较少。该假说认为, 当植物的潜在生长速度降低时, 植物产生的用于防御的次生代谢产物的数量就会增加 (Bazzaz, et al, 1987; Chapin, et al, 1987; Coley, et al, 1985)。这是因为, 一方面, 在环境胁迫条件下, 植物生长的潜在速度较慢, 受到损害时, 其损失的相对成本较高, 必然会产生较多的防御性物质用于防御。此外, 在适宜的环境条件下生长的植物, 其生长速度较快, 产生次生代谢产物的相对成本较高, 因而其数量就少。

1.2 喜 树

喜树 (*Camptopheca acuminata* Decaisne), 蓝果树科 (Nyssaceae) 喜树属 (*Camptotheca*) 多年生亚热带落叶阔叶树, 此属仅喜树一种植物。喜树是我国特有种, 古代曾称之为旱莲, 现又叫旱莲木 (江苏、江西和四川)、滑竿子树 (云南)、水栗子 (四川)、千张树 (四川)、水桐树 (广东、广西)、天梓树 (湖南)、土八角 (贵州)、千丈树 (四川)、水棕树 (广东)、秧青树 (四川)、野芭蕉 (贵州) 等。喜树高为 25~30 m。树干通直圆满, 树冠宽广, 姿态优美, 枝叶茂密, 萌芽力强, 病虫害较少, 一般多选为“四旁”绿化树种, 很少成片造林。

1.2.1 喜树的生活史

喜树于每年 3 月下旬开始抽梢, 7~8 月为盛期, 9 月中下旬高生长基本停止; 径生长以 7 月上旬至 8 月最快, 10 月中旬生长

基本停止。

喜树生长速度快，速生期早。3~10年为树高生长速生阶段，一般年生长1.0~1.8m，最大生长值出现在4~10年。郁闭度较大的林分，喜树高生长则会更快，年生长最高为2.0~2.2m。10~30年间高生长稍减，年高生长0.7~0.8m。30年后为生长缓慢阶段，年平均高生长0.4m左右。40年以后处于比较稳定阶段，每年增高很少。胸径生长3~20年为速生阶段，连年生长量1.0~2.0cm，最大值出现在6~15年。20~35年每年增长0.8~0.9cm，40年以后生长缓慢，但能持续到55年左右，连年生长量在0.6cm以上，直到85年连年生长量仍有0.3cm。由于喜树胸径生长持续时间长，故一百年生的喜树胸径即可达1m左右。

喜树一般5~7年始花、结果。每年5月中下旬始花，花期可一直持续到8月初。6月下旬7月上旬开始结果，果实生长一直到10下旬或11月上旬，10月下旬、11月初果实成熟。

1.2.2 喜树的适生立地条件

喜树属于亚热带喜温暖湿润的落叶树种，影响其分布的限制因子主要是温度和湿度。年平均气温在14~18℃，年降水量在1000mm以上，且分布较均匀；1月份平均气温不低于2℃，相对湿度80%以上的地区均为其适生范围。喜树不耐低温，在0℃以下常使幼树梢端枯萎。

喜树为喜光树种，深根性，在山地黄棕壤、红壤、黄壤、紫色土等多种土壤类型上均生长良好。喜树对土壤的酸碱度要求不高，在酸性、中性和微碱性土壤均能适应，在土层深厚、疏松肥沃湿润、微酸性至中性的土壤上（以pH值为6.0~6.5最好）生长更为良好；在干燥瘠薄、含石砾较多的微碱性土壤上，虽能适应，但生长缓慢。这种情况在以石灰岩山地为主的贵州省和广西

壮族自治区最为明显。

喜树耐水湿，在地下水位较高的平坝、河边、小溪边和田埂上均生长良好。通常分布于海拔400~1600 m间，以400~1000 m生长最好，1200 m以上生长稍慢，幼树常出现枯梢现象。但在海拔较高的云南省垂直分布可达2100 m，以1300~1800 m生长较好，超过1800 m幼树就会枯梢（中国树木志编委会，1983）。

1.2.3 喜树的资源利用

喜树全株各部分均含喜树碱，对白血症、胃癌等多种癌症和艾滋病等具有显著的功效。

喜树枝叶所含营养元素丰富。据分析，干叶含氮2.62%、磷0.51%、钾2.56%。每500 kg干叶的肥分相当于磷酸铵65.5 kg、过磷酸钙12.7 kg、硫酸钾25.5 kg。因此，喜树叶是较好的绿肥。

喜树叶对有害气体（如二氧化硫、氟化氢、氮氧化物）的抗性较强，是环境污染较严重地区的优良绿化树种（李一川，1990）。

喜树材质轻软坚韧，容易干燥，但不耐腐，容易感染蓝变色菌；喜树木材切削容易，切面光滑，花纹较美观，油漆后光亮性也较好，因此，喜树木材可作为室内装修用的装饰条。另外，喜树木材又是农具、包装、造纸、火柴杆、胶合板等工业原料（《四川森林》编辑委员会，1992）。

此外，喜树在一些少数民族地区自古以来即为重要药材，全株入药，用于治疗恶性疗毒、肿瘤，效果非常好。主要用法：取新鲜或干植物（叶、果、枝或皮）捣碎后以酒调均匀，外涂于病区，每日一次。另外，在我国的一些中草药著作里也有关于喜树用于治疗恶性肿瘤、疮痈等的记载。《江西中草药学》记载可用

喜树嫩叶治疗疖肿、疮痈初起（配方：喜树嫩叶1握，加食盐少许，捣烂，外敷）。《浙江民间常用草药》载有用喜树皮（或树枝）治牛皮癣的方法〔用法：喜树皮（或树枝）切碎，水煎浓缩，然后加羊毛脂、凡士林调成10%~20%油膏，外搽；另取树皮或树枝30~60g，水煎服，每日一剂；亦可取叶加水浓缩后洗患处〕（《全国中草药汇编》编写组，1983；江苏中医学院，1985；杨济等，1994；郎伟君等，1996）。

在云南漾濞和湖南岳阳，自20世纪50年代起，汉、白族农民多用喜树叶做水稻（一年一季）的秧苗绿肥，水稻产量明显提高，并且少有病虫害发生。

1.2.4 研究现状

据有关文献资料统计，从1848年喜树第一次有文献记载，到1966年其体内的抗癌有效成分——喜树碱被分离出来的100多年间，全世界共有25篇有关喜树的出版物。之后，1971~1975年间出现了喜树和喜树碱研究的第一个高峰。这期间，平均每年有28篇有关喜树和喜树碱的植物学、生态学、化学、药理学、临床医学等论文发表。不过，随后发现了喜树碱的临床毒副作用难以克服，1975~1986年的12年间，相关研究大大减少。1985年，喜树碱抑制DNA拓扑异构酶I（Topoisomerase I）的独特抗癌机理的揭示带来了喜树及喜树碱研究的第二个高潮，从1987~1993年，每年平均有104篇、共计730篇的有关论文发表，而从1994~1999年相关的论文数量更是达到1333篇，仅1999年1~10月间即有263篇相关文章发表。目前喜树及喜树碱研究内容不仅广泛深入，研究水平也日益提高，已逐渐形成一个抗癌药物研究的重要领域。但这些研究中90%以上是关于喜树碱的药理性质、药物开发、化学合成及其衍生物药物的临床试验等方面的内容，有关喜树的研究十分有限。

有关喜树生物学方面的研究除了分类学方面的以外，吴泽民（1983）、李林初（1986）分别对喜树的染色体数目和长度进行了研究。张恩汉等（1983）研究了喜树花芽的分化和性别。周佑勋（1989）研究了喜树种子休眠和萌发特性。李一川等（1990）对喜树净化空气能力和对 SO₂ 的耐性进行了研究，结果表明喜树对 SO₂ 耐性大，净化空气能力强。张务民等（1990）、肖康琳（1990）、黄学恒等（1993）、龚其锦等（1993）分别报道了危害喜树的叶蝉和黄毒蛾的生物学特性，并提出了防治办法。傅松玲（1992）对喜树一年生播种苗从播种到年生长结束的生长规律进行了探讨。廖海民（1993）对喜树幼苗的外部形态和解剖特征做了描述。刘济明等（1997）对喜树种子的天然扩散进行了研究。席梦利（1997a）对喜树的叶表皮结构进行了扫描电镜观察，并对喜树原形成层到形成层的转化进行了研究（席梦利等，1997b）。姚建祥等（1997）选择中国南方的广东、福建、浙江、安徽、江西、湖南、贵州、云南、湖北和江苏 10 个省的 18 个喜树种源，以半月高生长量和苗期冻害为指标，进行一年生播种苗的苗期优势研究，认为湖北和浙江丽水的种源比较优良。刘济明（1998）对喜树种子休眠进行了研究。李凤兰（1998）比较了喜树与珙桐茎次生木质部的解剖构造。黄劫（1999）研究了喜树幽斑螟的防治技术。石柏林（1999）初步研究了不同种源喜树苗的高生长规律。陈章和（1999）研究了喜树茎向生长的季节节律。于涛等（1999）分析了喜树种子挥发油的化学成分。张秋娟（2000）分析了 pH 值胁迫对喜树苗期生长和几项生理指标的影响。田宝忠（2000）研究了喜树种子萌发和更新潜力。周国模等（2000）对喜树幼树和枝条的生长规律进行了研究。冯建灿等（2000）对喜树及喜树碱开发利用进展进行了综述。López - Meyer 等（1994）对喜树幼苗中各部位喜树碱含量进行了分析，并发现喜树嫩叶为喜树碱富含器官。Vincent（1997）等研究了喜树叶的