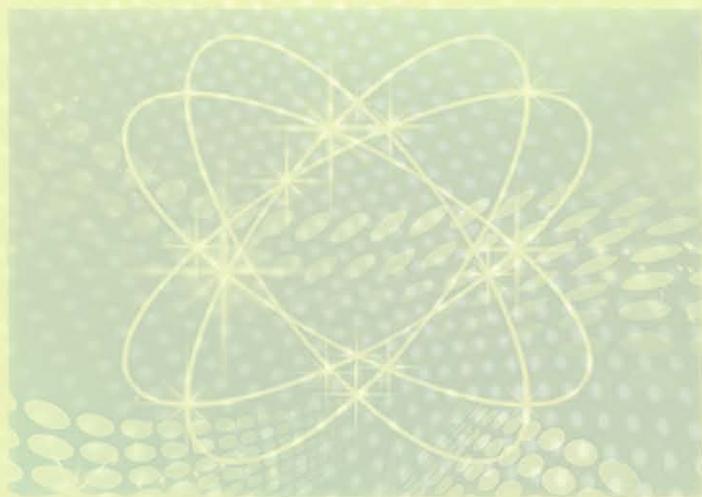


# 红景天甙生物合成代谢途径 分子机制及其调控的研究

张继星 于寒松 著



内蒙古科学技术出版社

# 红景天甙生物合成代谢途径 分子机制及其调控的研究

张继星 于寒松 著

内蒙古出版集团  
内蒙古科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

红景天甙生物合成代谢途径分子机制及其调控的研究 /  
张继星, 于寒松著. —赤峰: 内蒙古科学技术出版社,  
2013. 3

ISBN 978-7-5380-2265-0

I. 红... . 张... 于... . 景天属—生物  
合成—合成代谢—分子机制—研究 . Q949.751.1

中国版本图书馆CIP数据核字 (2013) 第056092号

出版发行: 内蒙古出版集团 内蒙古科学技术出版社

地 址: 赤峰市红山区哈达街南一段4号

邮 编: 024000

电 话: (0476) 8226867

邮购电话: (0476) 8224547

网 址: www.nm-kj.com

责任编辑: 马洪利

封面设计: 永 胜

印 刷: 赤峰富德印刷有限责任公司

字 数: 290千

开 本: 787 × 1092 1/16

印 张: 11.5

版 次: 2013年3月第1版

印 次: 2013年3月第1次印刷

定 价: 39.80元

# 前 言

植物是人类赖以生存的食物和药品的重要来源之一。植物体在长期进化过程中形成一系列生成和分布具有种属、器官、组织和生长发育期特异性的小分子有机化合物,即植物次生代谢产物。植物次生代谢产物种类繁多,结构迥异,为人类提供了丰富的药物、香料和工业原料。人们已知的3万多种天然产物中有80%来源于高等植物。就药物而言,全美药方中四分之一的药品来源于植物次生代谢产物。我国市售中成药中,从植物中提取的药物或经半合成的药物约占商品药的20%。从天然产物中寻找新的生理活性成分,开发新药成了全球关注和研究的热点,而且天然产物已越来越多地被用于保健食品、美容化妆、天然香料、天然色素乃至天然杀虫剂等产品的生产上,对天然产物的需求表现出日益增加的趋势。然而,伴随市场需求和开发急剧增加,导致许多珍稀药用植物生物资源存量锐减。21世纪是生命科学世纪,利用基因工程来调控植物次生代谢,获得有用的次生代谢物质在药用植物及其他领域取得了令人瞩目的进展。

红景天是景天科(Crassulaceae)红景天属(*Rhodiola rosea* L.)植物,为多年生草本或亚灌木,常具肉质匍匐根状茎。红景天属植物在全世界约有90多种,分布于东亚、中亚、西伯利亚及北美地区,我国约有73种,约占世界红景天种质资源的80%以上,主要分布于东北、华北、甘肃、新疆、四川、西藏及云贵地区。红景天全草都可入药,是珍稀药用植物之一。

早在1200年的藏医《四部医典》中红景天已被作为“神药”。1596年,李时珍《本草纲目》中已述“景天,上品,甘涩、无毒,治肺疾”。1995年版《中华人民共和国药典》已将其作为“九味石灰华散”盛方中的一种成分,具有清热、滋补元气的功效。20世纪60年代中期,前苏联基洛夫军事学院发现红景天具适应原作用。随后,前苏联科学家对红景天进行了大量的研究,并于1970年将红景天作为“适应原”样药物,由前苏联保健部审定为“人参型兴奋剂”,用做宇航员、飞行员、潜水员、运动员等的必备保健药品,以消除疲劳、增强活力。现已研究表明:红景天具有明显的抗缺氧、抗寒冷、抗疲劳、抗辐射、抗病毒、延缓机体衰老等功效,对于航天、深海、沙漠、高原、体育等行业是一种极具开发应用前景的环境适应药物,同时对高辐射从业人员、微机使用频繁人员、强脑力劳动者、中老年人群具有积极的滋补保健作用。然而,红景天属植物由于生态学、生殖生理原因、人工栽培受限等原因,野生资源锐减。

因此,了解红景天资源的植物学特征和地理分布,研究红景天植物器官化学成分和药用价值,探讨红景天繁殖和种植技术、鉴定方法,以及细胞悬浮培养、人工合成药物和保健食品开发利用等问题,对更好地开发和利用红景天这一珍稀植物资源是很有意义的工作。近些年来,为了保护红景天珍稀野生药用植物资源和提高更有价值的次生代谢物质的产量,以及开发新途径,众多学者做了许多工作。目前,世界范围内对红景天的研究主要集中于我国,研究领域涉及化学成分、药理作用、资源保护与人工栽培、组织培养与快速繁殖、抗冻蛋白、细胞培养与生物转化,以及RAPD分析与分类鉴定等方面。这些方面的研究成果大大丰富了红景天资源的开发和利用的途径,有效地推动了红景天在药物和食品领域的开发及利用。

随着生物技术的发展,利用现代生物技术如基因工程、酶工程、发酵工程等技术大量制备红景天甙是满足市场要求的又一个有效途径,但明确红景天甙(salidroside)在植物体内生物合成代谢途径及分子机制,是利用生物技术手段生产红景天甙的前提和基础。

红景天属植物其主要活性成分为红景天甙(salidroside)、甙元酪醇(tyrosol)等。根据相关报道,酪醇糖基化生成红景天甙的反应是由UDP-葡萄糖和酪醇为底物,在UDP-葡萄糖基转移酶催化合成的,但酪醇生物合成代谢途径尚不清楚。近些年来,本研究小组以高山红景天为材料,在红景天功能物质特别是红景天甙及其前体物质酪醇生物合成代谢途径分子机制方面,做了一些工作,取得了一定的成果。并结合查阅的大量国内外最新研究的有关资料,著成《红景天甙生物合成代谢途径分子机制及其调控的研究》一书。本书分为红景天属植物研究进展、红景天甙代谢合成可能途径及次生代谢分子调控,红景天甙生物合成途径上游、下游相关关键基因的分离、特性分析、功能鉴定及分子调控,探索利用转基因发根技术生产红景天甙等几部分。旨在阐明红景天甙生物合成代谢途径的分子机理,为利用生物工程手段生产红景天甙,开发和利用珍稀药用植物资源红景天起到抛砖引玉的作用。

本研究成果由内蒙古民族大学生命科学学院的张继星和吉林农业大学食品科学与工程学院的于寒松共同完成,各承担一半的撰写任务,每人14.5万字。本研究得到作者的导师——原中国人民解放军军需大学少将、现吉林大学植物科学学院博士生导师李彦舫教授的悉心指导,以及北京农学院马兰青博士、吉林大学植物科学学院高东尧博士的无私帮助,内蒙古科学技术出版社对本书的出版给予了大力支持,谨在此表示衷心感谢。同时,内蒙古民族大学生命科学学院李梦竹、冯紫洲、李毅、佟欢等同学在本书文字校对及图表编辑等方面做了许多工作,在此表示感谢。

由于作者水平有限,疏漏错误之处在所难免,谨请读者批评指正。

作者  
2012年12月

## 目 录

第一章 红景天属植物研究进展 .....	1
1 红景天植物资源概况 .....	1
2 红景天的药用历史 .....	1
3 红景天的化学成分 .....	2
4 红景天药理学研究 .....	3
5 红景天生药分类学研究 .....	5
6 红景天野生资源锐减及解决资源短缺的途径 .....	5
6.1 红景天属植物生态学原因 .....	5
6.2 红景天属植物生殖生理原因 .....	5
6.3 人工栽培 .....	6
6.4 组织培养及快速繁殖 .....	6
6.5 悬浮细胞培养 .....	6
6.6 发根培养 .....	7
7 红景天的有效成分提取制备 .....	7
7.1 酪醇的提取与制备 .....	8
7.2 红景天甙的提取与制备 .....	8
8 红景天产品的开发 .....	9
8.1 红景天功能食品的开发 .....	9
8.2 红景天中药制剂及化妆品的开发 .....	9
参考文献 .....	10
第二章 红景天甙生物合成途径及分子调控 .....	15
1 细胞培养 .....	15
2 植物次生代谢产物代谢合成途径及分子调控 .....	15
2.1 次生代谢及次生代谢产物 .....	15
2.2 植物次生代谢物合成途径及分子调控 .....	21
2.3 植物次生代谢的基因工程 .....	24
3 红景天甙代谢合成可能的途径 .....	26
4 红景天甙代谢合成的相关酶 .....	28
4.1 UDP-葡萄糖转移酶 .....	28
4.2 酪氨酸脱羧酶 (PAL) .....	35
4.3 酪氨酸脱羧酶 (TyrDC) .....	36
参考文献 .....	38

第三章 高山红景天苯丙氨酸解氨酶基因 ( <i>PALClI</i> ) 克隆、功能鉴定及分子调控 .....	52
1 <i>PALClI</i> 基因克隆及特性分析 .....	52
1.1 材料与方法 .....	52
1.2 结果与分析 .....	64
1.3 讨论 .....	73
2 <i>PALClI</i> 基因转化高山红景天及分子检测 .....	75
2.1 材料与方法 .....	76
2.2 结果与分析 .....	81
2.3 讨论 .....	87
3 <i>PALClI</i> 的功能鉴定及分子调控 .....	88
4 结论 .....	88
参考文献 .....	89
第四章 高山红景天苯丙氨酸解氨酶基因 ( <i>PALClI</i> ) 克隆、功能鉴定及分子调控 .....	91
1 <i>TyrDCI</i> 克隆及特性分析 .....	91
1.1 材料与方法 .....	92
1.2 结果与分析 .....	96
1.3 讨论 .....	104
1.4 结论 .....	106
2 <i>TyrDCI</i> 功能鉴定及分子调控 .....	106
2.1 材料与方法 .....	107
2.2 结果与分析 .....	111
2.3 讨论 .....	119
2.4 结论 .....	121
参考文献 .....	121
第五章 高山红景天糖基转移酶基因 ( <i>UGTs</i> ) 克隆、功能鉴定及分子调控 .....	123
1 高山红景天糖基转移酶基因 ( <i>UGTs</i> ) 克隆及特性分析 .....	124
1.1 材料与方法 .....	124
1.2 结果与分析 .....	132
1.3 讨论 .....	144
1.4 结论 .....	145
2 高山红景天糖基转移酶基因 ( <i>UGTs</i> ) 催化功能分析及分子调控 .....	146
2.1 材料与方法 .....	146
2.2 结果与分析 .....	149
2.3 讨论 .....	154
2.4 结论 .....	155
参考文献 .....	155

第六章 发根农杆菌介导的葡萄糖基转移酶基因 ( <i>UGTs</i> ) 转化高山红景天	157
1 材料与amp;方法	157
1.1 植物材料	157
1.2 菌种、载体及试剂等	157
1.3 高效植物表达载体pCAUGTC1、pCAUGTC2和pCAUGTR的构建	158
1.4 表达载体的酶切和PCR鉴定及序列测定	160
1.5 重组表达载体和pCAMBIA1301转化发根农杆菌 (ATCC15834)	160
1.6 发根农杆菌介导高山红景天的转化及阳性筛选	161
1.7 转基因发根的鉴定	162
2 结果与分析	164
2.1 pCAUGTC1、pCAUGTC2和pCAUGTR载体的构建	164
2.2 重组载体pCAUGTC1、pCAUGTC2和pCAUGTR载体的鉴定	168
2.3 转基因发根系统的建立	168
2.4 转基因发根的鉴定	169
2.5 高山红景天转基因发根红景天甙的HPLC检测	170
3 讨论	171
3.1 转化系统的选择	171
3.2 本课题组取得的成绩	172
3.3 转基因系统的构建	173
3.4 转基因发根检测	173
4 结论	173
5 展望	174
参考文献	174
附录 英文缩写词表	176

# 第一章 红景天属植物研究进展

随着现代高新科学技术的发展,进入缺氧的高空、高寒的极地及微波辐射等特殊环境中从事专业活动的人员越来越多,而工业、农业的发展,尤其是工业三废、农药等导致我们生活的环境日益恶化,危害着人们的身体健康乃至生命安全;同时,人民生活水平和素质也在不断提高,人们更加关注自身的健康。因此,迫切希望能找到一些安全性高的保健药物或食品,以此调节机体内环境,或适应某些特殊的不良环境造成的不良影响。

红景天是一种珍稀植物资源,可在极其恶劣而多变的自然环境中生长,如高寒、干燥、缺氧、强紫外线照射、昼夜温差大等,所以它对环境具有极强的适应性和顽强的生命力,这就意味着它从遗传上适应高寒等恶劣环境,或说它具备了其他植物所没有的具特殊适应性的物质。红景天全草都可入药,具有明显的抗缺氧、抗寒冷、抗疲劳、抗辐射、抗病毒、延缓机体衰老,防止老年疾病等功效,对于航天、深海、沙漠、高原、体育等行业是一种极具开发应用前景的环境适应药物,同时对高辐射从业人员、微机使用频繁人员、强脑力劳动者、中老年人群具有积极的滋补保健作用<sup>[1]</sup>。研究开发红景天,在军事医学、航天医学、运动医学及预防医学上都具有十分重要的意义,并且,还可以以此推动环境适应新药和第三代功能性食品的研究与开发,因而引起人们的广泛关注。

## 1 红景天植物资源概况

红景天系蔷薇目景天科(Crassulaceae)红景天属(*Rhodiola rosea* L.)多年生草本或亚灌木野生植物,花、根、茎之浸液均呈红色而得名。梗颈(collum)肉质,粗或细,被基生叶或鳞片状叶,先端部分通常出土。花茎发自基生叶或鳞片状叶的腋部,一年生,老茎有时宿存,茎不分枝,多叶。茎生叶互生,无托叶,不分裂。其高一般5~20cm,聚伞花序顶生,7—8月开花,花色淡黄或紫红至红色。茎叶嫩绿,常具肉质,匍匐的根状茎,一般成片密集生长于高海拔地带<sup>[2]</sup>。红景天属(*Rhodiola rosea* L.)植物在全世界约有90多种,分布于东亚、中亚、西伯利亚及北美地区,我国约有73种,2亚种、7变种,约占世界红景天种质资源的80%以上,主要分布于东北、华北、甘肃、新疆、四川、西藏及云贵地区<sup>[3]</sup>。国内学者对西藏、河北、长白山高山冻原带等地的红景天属植物进行了实地资源调查<sup>[4]</sup>,部分红景天生长在海拔800~2 500m高寒无污染的灌木丛林中,大多数生长在海拔3 500~5 000m的高山流石上。由于其生长环境极其恶劣,如缺氧、低温干燥、狂风、强紫外线照射、昼夜温差大,故它已从遗传上适应高寒多变的恶劣环境,而具有很强的生命力和特殊的适应性。

## 2 红景天的药用历史

红景天植物在中国已有悠久的药用历史,它独特的生理活性成分和较强的药理效果深受

世人关注。很早以前,我国民间就以其根和根状茎入药,煎水或泡酒服用,用于抗疲劳、抗严寒等,有“八宝草”、“东方神草”、“黄金植物”、“高原人参”等美誉。最早见于公元1200年的藏医《四部医典》中,记为“神药—苏罗玛葆”,即指现在的宽瓣红景天(*Rhodiola euryphlla* Frod.)。秦汉时期成书的《神农本草》记载,服红景天“轻身益气、不老延年”,盛赞红景天“主养命以应天,无毒,多服、久服不伤人”,被列为上品之药。汉藏医药古籍《度川本草》、《本草纲目》等均亦记载了其药用价值,《本草纲目》誉之为“八宝草”、“火焰草”、“经中上品”,有“扶正固本、醒脑明目、轻身益气、久服通神不老”之功效<sup>[5]</sup>。清朝历代皇帝将红景天作为宫廷贡品,康熙皇帝在西北地区平息动乱的征战中因人参热量过盛而选用红景天作为清除军旅疲劳,提高战斗力的药物<sup>[1]</sup>。现代的医药书籍中根据红景天植物学特征分成多个种,作为药用见记载的有《中华人民共和国药典》(1985年版)、《四川省中成药标准》(1993年版)和《中国药典》(1995年版)<sup>[6]</sup>。我国卫生部1991年已批准红景天为新食品资源<sup>[7]</sup>。自20世纪60年代起,红景天引起前苏联科学家的极大重视并正式开始对其研究,红景天属植物就此进入现代生药学研究阶段。他们通过对人参、刺五加及红景天较为深入的研究提出“适应原”这一概念,即某些植物具有特殊的调节功能,使不同病因引起的病态指标向正常状态转变。认为红景天具有良好的适应原样作用,其免疫功能优于人参和刺五加,在此研究成果的基础上分离并分析了其活性成分,开发出相应产品,提供给前苏联宇航员使用,其作用旨在强心、抗疲劳、抗同温层大气空间过氧化作用。

### 3 红景天的化学成分

国内外对红景天属植物进行化学成分研究和成分预试的品种约20个,国内对以下种类研究较多,高山红景天(*Rhodiola sachalinensis*)<sup>[8]</sup>、德钦红景天(*Rhodiola atuntsuensis*)<sup>[9]</sup>、大花红景天(*Rhodiola crenulata*)<sup>[10]</sup>、狭叶红景天(*Rhodiola kirilowir*)<sup>[11-14]</sup>、喜马拉雅红景天(*Rhodiola himalensis*)<sup>[15]</sup>、帕里红景天(*Rhodiola phariensis*)<sup>[16]</sup>、菱叶红景天<sup>[17]</sup>、圣地红景天<sup>[18]</sup>等红景天植物中先后分离出100多种化学成分,这些物质主要分三类:一是红景天甙、甙元酪醇、黄酮类、酚类和没食子酸等重要的生理活性物质,其中红景天甙(salidroside)及其前体甙元酪醇(tyrosol)是经过药理学研究,证明有特殊生理功能的有效单体,迄今已报道的近20种红景天植物化学研究结果,大部分含有这两种有效成分;二是多种氨基酸,包括苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、色氨酸、组氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸等18种氨基酸;三是多种无机元素,其中包括28种微量元素。

彭江南<sup>[14,19,20]</sup>等应用质谱和核磁共振等方法对大花红景天、长鞭红景天、狭叶红景天的化学成分进行了研究。在大花红景天中分离鉴定出5种化合物:草质素-7-O-β-L-鼠李糖甙(rhidiolin, ),草质素-7-O-(3-O-β-D-葡萄糖甙)-β-L-鼠李糖甙(rhodosin, ),酪醇(tyrosol, ),红景天甙(salidroside, )和没食子酸(gallic acid, )。其中和是在国产红景天中首次被发现的草质素类黄酮化合物,这种类型的类黄酮是红景天中另一类有效的成分,且更具特征性,仅在数种红景天属植物中发现<sup>[19]</sup>。在长鞭红景天和狭叶红景天中发现了酪醇(tyrosol)、红景天甙(salidroside)、胡萝卜甙(kaucosterol)等天然有效成分。同时在狭叶红景天中发现了有毒的生甙甙成分百脉根甙(lotaustralin)。大花红景天还含有尤其罕见的异

戊烯甙大花红景天素。

## 4 红景天药理学研究

近年来,红景天的多种药用功效吸引了国内外学者进行相关领域内的深入研究,研究领域和研究内容主要包括:

抗肿瘤、抗病毒等作用。红景天对肿瘤的抑制作用国内外均有报道。Dement eva-LA等<sup>[21]</sup>发现红景天能抑制体内肿瘤的发生。Salikhova RA等<sup>[22]</sup>报道了红景天防突变和对细胞核内DNA的修复功能。赵文<sup>[23]</sup>采用动物移植性肿瘤试验法观察了蔷薇红景天提取液对S-180实体型和H-22生长的抑制作用,并探讨了红景天提取液抑瘤作用的免疫学机制。结果表明,红景天提取液在1 250~5 000mg/(kg·bw)剂量范围内,能明显地抑制S-180在小鼠体内的生长,抑瘤率高达63.71%;在剂量为1 250mg/(kg·bw)时,能一定程度地抑制H-22的生长。Udintsev-SN<sup>[24]</sup>报道,红景天提取物或其化合物对Ehrlich肿瘤Pliss淋巴肉瘤及其扩散显示出抑制作用。王秀清<sup>[25]</sup>研究了灌喂红景天提取物后感染柯萨奇B5病毒的小鼠脾脏NK细胞活性及血清酶学变化,发现红景天对柯萨奇B5(coxB5)病毒有一定的抵抗作用。红景天甙抗柯萨奇B5病毒作用在于通过某种机制作用于细胞膜,阻止病毒颗粒的吸附。在试验中,病毒对照组细胞表面在电镜下出现破碎与孔洞,而红景天甙组与正常细胞形态相似,细胞膜完整无缺损。但红景天甙对coxB5病毒无直接灭活作用。朴花<sup>[26]</sup>研究表明红景天多糖对增强免疫功能有显著作用,并认为红景天多糖可作为一种免疫调节剂进行开发。阎奇<sup>[27]</sup>也证实红景天多糖对抗病毒有明显效果。孙非<sup>[28]</sup>通过试验发现红景天中的红景天甙元酪醇也是抗病毒成分。

抗疲劳、耐缺氧作用。韩健、杨克艳<sup>[29]</sup>通过对大花红景天的化学成分、药理及毒理学的研究表明:红景天强身剂能延长小鼠游泳时间,显示抗疲劳作用。蒋礼年、张逢秋<sup>[30]</sup>试验结果表明,大花红景天口服液对小鼠具有明显的动、静态抗疲劳作用。同时,高剂量试验组、低剂量试验组小鼠均具有明显的耐常压缺氧作用。黄增艳等<sup>[31]</sup>通过对小鼠血乳酸浓度、血清乳酸脱氢酶(LDH)活力、肝糖原和肌糖原含量的影响研究发现,高山红景天抗疲劳作用与其增强血清LDH活力,降低血乳酸含量,增加肝糖原和肌糖原的贮备有关。小鼠每日喂含有高山红景天的混合饲料,20天后测定结果表明,给药组小鼠游泳时间、耐化学缺氧能力和血红蛋白含量明显高于对照组。陈亚东等<sup>[32]</sup>采用常压耐缺氧、转棒、游泳法和耐低温方法测定,结果表明高山红景天可延长小鼠缺氧存活时间,延长小鼠转棒耐力时间和游泳持续时间,明显提高耐寒能力。曹晓哲等<sup>[33]</sup>通过对缺氧小鼠膈肌重量和膈肌细胞超微结构的研究表明,红景天对缺氧所致膈肌细胞损伤具有显著保护作用。

对机体的双向调节和增强免疫力作用。双向调节就是使肌体偏高于正常指标的病态表现恢复或趋向于正常。红景天对于维持机体平衡,进行双向调节有一定的作用。高琳<sup>[34]</sup>的研究证实红景天对高海拔地区人群的记忆力的衰退有显著的延迟作用。韩健、杨克艳<sup>[29]</sup>的试验发现红景天能延长戊巴比妥钠小鼠睡眠时间,说明其对神经系统有一定镇静作用。经兔慢性试验,注射红景天甙(4mg/kg)或红景天素(0.2ml/kg)能增强脑干网状系统的兴奋性,激活皮层感觉—运动区、视觉区以及皮层下主要结构的自发电位活动,增强对光、电刺激应答反应的电位改变;小鼠注射红景天甙(30~100mg/kg)能降低脑中5-羟色胺的水平,但不影响单胺氧化酶

或5-羟色胺脱羧酶的活性,红景天甙对鼠脑中儿茶酚胺代谢过程有明显影响,可使脑中去甲肾上腺素和多巴含量增加,改善多巴对血脑屏障的通透性,提高大脑皮质和海马等部位多巴和多巴胺浓度。红景天素(1ml/kg)具有对小鼠自发脑电的适应和同步化作用<sup>[35,36]</sup>。赵文<sup>[37]</sup>选择淋巴器官脏器系数、迟发型变态反应、脾脏抗体生成细胞数、巨噬细胞吞噬指数等免疫学指标观察藏产多种红景天对BALB/c小鼠免疫功能的影响,结果表明,在500~2000mg/kg剂量范围内能增加BALB/c小鼠胸腺的相对重量、足厚度及脾脏抗体生成细胞的数量。因此藏产红景天能增强小鼠细胞免疫及体液免疫的功能。金永日等<sup>[38]</sup>用高山红景天茎叶提取物按250mg/kg,500mg/kg给小鼠灌胃7天,可使正常小鼠免疫器官重量增加,亦能明显增强小鼠网状内皮系统的吞噬功能,提示红景天茎叶提取物具有抗应激和增强机体免疫功能的作用。

**抗衰老作用。**根据目前人们公认的Harman衰老理论<sup>[39]</sup>,随着年龄增长引起的退行性变化是由自由基的副作用引起的,红景天可通过有效清除自由基达到抗衰老作用。红景天复方制剂可抑制过氧化脂质的形成,清除自由基,延缓细胞的退行性变化<sup>[40]</sup>。韩健、杨克艳<sup>[29]</sup>还发现红景天强身剂还能提高大鼠红细胞,肝脏SOD活性,加速血浆、心脏、脑组织中LPO的消除;又可通过体内抗氧化酶抑制氧离子和氢氧根离子的产生,从而减少自由基对机体组织细胞的损害,或对延缓衰老起一定作用。红景天素可预防神经细胞核功能衰退,具有推迟和减少脂褐素的出现和堆积,减轻或推迟细胞代谢能力降低,维持血-脑屏障结构正常,改善循环,维持神经突触正常结构及其神经元间功能联系,减轻大脑皮质超微结构老化征象,起到延缓或预防衰老的作用<sup>[38]</sup>。

**抗辐射作用。**红景天甙可对抗X射线辐射、微波辐射对机体的影响,减少X线辐射引起的脾细胞破坏、外周畸形红细胞的产生以及心脏和肝脏LPO的产生,显著降低辐射引起的骨髓嗜多染红细胞微核产生率。电离辐射可使生物体内生成外源性自由基。由于自由基堆积可诱发组织细胞产生生物大分子自由基,从而使正常的化学结构发生破坏或交联,随结构的破坏或交联层次的逐步扩展会损伤正常组织细胞的形态和功能的完整性<sup>[41]</sup>。贾正平等<sup>[42]</sup>试验结果表明,狭叶红景天的水提取物对小鼠受<sup>60</sup>Co射线照射之后的生存率及骨髓造血功能有显著保护作用,说明狭叶红景天是一种具有潜在应用价值的辐射防护植物。经微波辐射后的小鼠,脑内单胺类递质、脾脏及胸腺内环磷腺苷cAMP、淋巴细胞转化率、血清溶血素等出现抵制性变化,使用红景天可使之恢复正常,具有扶正作用<sup>[43]</sup>。

**对心血管系统的作用。**红景天可减弱离体心肌的收缩性能,降低心脏负荷,改善心肌功能<sup>[44]</sup>。给大鼠由股静脉注入红景天甙和黄酮,发现红景天甙和黄酮均能降低心脏的前后负荷,改善心脏功能<sup>[45]</sup>。静脉注射红景天醇提取物,发现可使大鼠动脉血压明显升高,并呈现一定的剂量关系,且升压作用不能被心得安所阻断,证明红景天有一定的强心缩血管作用<sup>[44]</sup>。红景天可提高老年男性冠心病的红细胞超氧化物歧化酶(SOD)的活性,降低其血浆过氧化脂质(LPO)水平。红景天通过改善微循环降低血液黏度,减少或消除组织缺氧,促进红血素生成减少,红细胞产生下降从而达到治疗高原红细胞增多症<sup>[46]</sup>。

**对机体的保护和修复作用。**红景天提取物(1ml/kg ED<sub>50</sub>=0.43ml/kg)对肾上腺素和CaCl<sub>2</sub>引起的心率失常产生明显的抗心率失常及预防作用<sup>[47]</sup>。试验证明,口服红景天提取物(3.5mg/kg)对小鼠离体灌注心脏的收缩幅度降低有阻抑作用。红景天对心脏的保护作用可能与内源阿片样肽的水平增加有关<sup>[48]</sup>。刘亚玲<sup>[49]</sup>的研究表明:红景天对兔烫伤早期MODS具有一定的防治作用,

尤其是对烫伤后动物心肌和肾脏功能具有明显的保护作用。烫伤红景天治疗组SVR下降,CO增加,因此可供各器官更多血流量而减轻器官功能的损害。红景天能加强体内NO的合成,这可能是其作用机制之一。试验结果还表明,红景天对肺功能具有一定保护作用,这种作用也可能与NO合成增多有关。

本身毒性。给小鼠静脉注射红景天甙3g/kg,连续观察5天未见任何毒性反应,给小鼠静脉注射皂甙元LD50为(1 130±23)mg/kg,给小鼠腹腔注射LD50为1 260mg/kg,灌胃达3 000mg/kg,未见死亡,故毒性较低<sup>[50]</sup>。

## 5 红景天生药分类学研究

自20世纪60年代前苏联基洛夫军事医学院正式研究开始,红景天属植物进入了现代生药学研究领域。在红景天属植物生药鉴定方面,目前常规鉴定方法主要包括显微鉴别和核磁共振指纹图谱法。随着分子生物学技术不断发展,分子标记技术在植物系统分类和生药鉴定方面应用的报道逐年增加。根据红景天基生叶、根茎、花瓣、心皮等植物学分类鉴定特征,安丰等人编制了四川红景天属植物分种检索表<sup>[51]</sup>,王西芳等人对红景天属6个种及2个变种药用植物的性状鉴别进行了研究<sup>[52]</sup>,钱彦丛等人对狭叶红景天、小丛红景天进行了显微结构和紫外光谱的鉴定工作<sup>[53]</sup>,胡挺松等运用分子标记技术对高山红景天、狭叶红景天、长鞭红景天、大花红景天进行了RAPD分析与分类鉴定<sup>[54]</sup>,以上研究初步形成了红景天品种鉴定的方法和标准。

## 6 红景天野生资源锐减及解决资源短缺的途径

### 6.1 红景天属植物生态学原因

绝大多数种类的红景天生长在高寒山区的雪线以下,森林上限以上的风化很强的流石滩中,即分布在海拔4 000m以上,5 100m以下的地区,主要集中在海拔4 600~4 900m的高度范围。该生态系统属于冻原植被带的高寒草甸生态系统,它是一个非常脆弱的生态系统<sup>[55]</sup>。目前,由于过度放牧和人为的无计划采挖,使该系统中作为建群种之一的红景天种群数量呈下降趋势,分布格局受到严重破坏。这一方面会限制红景天种群本身的维持与发展,另一方面其数量和格局的变化,又会影响其伴生种的数量和格局,使高寒草甸生态系统的稳定性下降<sup>[56]</sup>。随着人们对红景天新的药理学作用认识的不断深入,需求的不断扩大,如果资源供给问题得不到有效解决,红景天本身脆弱的原生生态系统就难以得到维持和保护,这必将导致红景天属植物生物资源的减少和遗传多样性资源的丧失,进而导致红景天赖以生存的原生生态系统的破坏。

### 6.2 红景天属植物生殖生理原因

红景天主要是花粉表面光滑,几乎没有突起,只有一些纵横交错的条纹,光滑的花粉不利于昆虫携带和柱头接受,从而减少了受精可能性。红景天花粉存在二型性,圆型花粉经常

可见在药室内也萌发,而长型花粉没有生活力,在成熟柱头刺激下,适宜环境条件下不见其萌发,可见这两种花粉对CS株受精都存在障碍,不萌发的花粉以及提前萌发的花粉都会使CS株受精可能性大大降低。外因主要是传粉过程需要足够的昆虫传粉者才能保证传粉成功,但分布区内风大,气温低,海拔高,传粉昆虫较少,没有专一传粉昆虫,传粉效率低。此外,生长季节内空气湿度大,雨量充沛,而只有晴好的天气才能保证传粉活动,减少花粉损失。另外,该种群无性生殖扩大种群的速度慢,而且扩展范围有限。特别是近年来,人们对其有效成分红景天甙的认识,对其野生资源大量的采挖,使红景天的天然储量锐减,使该物种正常延续后代变得非常困难<sup>[57]</sup>。

### 6.3 人工栽培

人工栽培方面由于其适合在高寒干燥的环境中生长,不耐高温、潮湿的气候及易发病等原因,大面积栽培至今尚未成功。目前尚无良策解决不耐高温的问题,而且在人工引种栽培时根茎腐烂较为严重。

### 6.4 组织培养及快速繁殖

刘世强、罗明<sup>[58,59]</sup>等对高山红景天组织培养进行了广泛的研究,对不同外植体脱分化能力的差异,不同种类及浓度的生长素和细胞分裂素的组合对愈伤组织的生长和分化的影响进行了详细的报道。本试验室也对大花红景天、长鞭红景天、狭叶红景天和高山红景天组织培养进行了深入的研究<sup>[60,61]</sup>。通过对高山红景天相关研究表明<sup>[62-64]</sup>:高山红景天组织培养的最适温度为21~25℃,最适pH为5.8,自然光照辅助1000lx照明10~12h,发现光照对愈伤组织生长影响不显著,但不利于红景天甙的合成,黑暗对愈伤培养有利;诱导材料方面以种子、叶片、茎为外植体诱导的愈伤组织分化能力较强,以根为外植体则不易诱导出愈伤组织,以胚轴为外植体诱导的愈伤组织不能分化。从不同激素种类和浓度的组合对愈伤组织的生长和分化的效果看,MS基本培养基附加1.5mg/L 6-BA、0.2mg/L NAA最有利于愈伤组织分化,而附加3.0mg/L 6-BA、0.3mg/L NAA最有利于愈伤组织生长;附加2.0mg/L 6-BA、0.25mg/L IAA芽的分化率高,加入GA 0.05mg/L可使芽伸长速度加快,丛生芽在MS培养基上或B5附加IAA 0.5mg/L的培养基上可诱导生根并形成完整植株,完全苗经练苗后可移栽定植。另外,为保持愈伤组织的新鲜状态和旺盛的细胞分裂、生长能力,应在培养第20~25天转接继代,而作为培养物的收获可在培养第30天后进入缓慢静止期进行。可见,利用诱导愈伤组织分化成植株的方法可作为快速繁殖红景天的有效手段。

综上,加强对红景天野生资源的保护力度,同时从生物学角度加强对红景天属植物的研究,运用生物工程、基因工程手段生产人们需要的功能性成分势在必行。

### 6.5 悬浮细胞培养

利用植物细胞培养技术筛选出快速生长又能产生红景天有效生物活性成分的愈伤组织、

细胞系来大规模生产药用成分,是解决红景天供不应求的有效方法之一。目前国内进行的高山红景天细胞大规模培养的研究中以大连理工大学最为成熟<sup>[65-72]</sup>。许建峰等分别以高山红景天根、茎、叶及种子萌发的子叶为外植体诱导5种愈伤组织,并比较了5种愈伤组织的生长速率及红景天甙的积累能力,并系统地研究了高山红景天细胞悬浮培养的动力学规律及过程调控。试验证明,红景天甙合成与细胞生长偶联;在高山红景天细胞悬浮培养过程中,3mg/L 6-BA+ 0.3mg/L NAA、60mmol/L 氮源(其中 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 为1:1)、0.1~0.125 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和200mg/L 蛋白胨较适合于细胞生长和红景天甙的积累;通过降低培养基pH值能有效地诱导培养细胞中红景天甙的细胞释放,红景天甙的跨膜运载是一个与 $\text{H}^+$ 对运的动态过程,培养基pH值决定了红景天甙在胞内外含量的分布。细胞组织在pH大于3的培养基中处理3h以内,对细胞活性的影响不大。将诱导释放过的细胞组织转入到新鲜的生产培养基中,细胞仍然具有合成红景天甙的能力。建立了细胞悬浮生长和营养成分摄取动力学及其计量关系,研究了致密愈伤组织颗粒内氧传递特性与细胞活性的关系,建立了高山红景天致密愈伤组织颗粒悬浮培养结构化动力学模型。还探索了红景天甙生物合成的可能途径:认为甙元酪醇是经由莽草酸途径合成的,在此基础上又研究了前体及真菌诱导物的加入对红景天生物合成的调控作用。通过两种调控机制组合运用最终使得培养细胞中红景天甙含量达到1.7%,已大大超过野生植株的含量。进行了气升式反应器培养高山红景天愈伤组织颗粒的动力学与氧传递特性研究,最终已在气升式反应器中实现了大规模培养,这都为高山红景天资源的开发和利用开辟了新的有效途径。

## 6.6 发根培养

徐洪伟等人<sup>[73]</sup>建立了高山红景天毛状根培养系统,研究结果表明毛状根生长的最佳条件为1/2  $\text{MS}_0$ ,液体培养基、散射光、温度为20℃左右、pH值4.5~4.8;在红景天毛状根培养过程中给予一定低温(14℃左右)的处理红景天甙含量有所提高,利于毛状根生长,这可能与红景天在恶劣环境中生长有关。

毛状根培养是近10年发展起来的一种新的培养系统,自1977年Acketmann C.<sup>[74]</sup>首先成功地用发根农杆菌转化高等植物以来,迄今已有100多种植物建立了培养系统。由于毛状根具有生长速度快、分枝多、弱向地性,处于器官化水平,激素自养,生理生化、遗传特征稳定,有稳定的次生代谢物合成能力55kDa、50kDa和50kDa左右优点,因此利用毛状根培养替代野生资源生产植物此生代谢物质具有很大的优势。红景天毛状根培养系统的研究目前还不够深入,在分子水平上构建转基因发根培养系统还未见报道,利用基因工程和发酵工程技术进一步提高毛状根的红景天甙的含量具有很好的研究和开发前景。

## 7 红景天的有效成分提取制备

由于红景天甙及甙元酪醇为红景天主要功能性成分,本文以这两种物质的提取、制备和检测研究进行综述。

## 7.1 酪醇的提取与制备

酪醇也具有很多方面的生理学活性,例如抗疲劳、抗缺氧、抗应激、抗寒冷、镇静等作用<sup>[75,76]</sup>。制备酪醇技术比较成熟,一般采用合成的方法,如Cheng CS等<sup>[77]</sup>人以对甲氧基苯乙醇为原料,与47%氢碘酸进行脱甲基和取代反应,再水解来获得酪醇;Yamada SI<sup>[78]</sup>等人以对羟基苯乙胺为原料,经乙酰化、亚硝化、重排、水解制备酪醇;纪淑芳等人<sup>[79]</sup>以对氨基苯乙醇为原料经重氮化,水解制得酪醇;郑红等人<sup>[80]</sup>报道了,以对溴酚为原料经苄基保护、烃化、脱苄基制得酪醇。近年来也有人研究酪醇的提取方法,但一般都是和红景天甙共同提取。例如:李辰等人<sup>[81]</sup>研究了利用乙醇提取红景天中红景天甙和酪醇的工艺,确定了以6倍量80%乙醇提取2h,提取2次为最佳提取工艺;马涛等人<sup>[82]</sup>应用正交试验法提取云南大花红景天中的红景天甙和酪醇,筛选出最佳的提取条件为:提取温度65℃,提取时间15min,90%甲醇或无水甲醇和1:20料液比,提取的红景天甙和酪醇的质量分数分别达到0.56g/mg和0.15g/mg。

## 7.2 红景天甙的提取与制备

由于红景天甙为红景天最主要的功能性成分,因此红景天的提取与制备方法成为研究的热点。起初红景天甙粗品的提取一般利用水提取、有机溶剂提取等方法。近年来,随着微波超声波、生物技术等现代技术在中草药有效成分提取上的利用,许多科研人员也开始利用这些技术进行红景天甙提取的研究。

### 7.2.1 水、有机溶剂提取法

李成等<sup>[83]</sup>对高山红景天的提取工艺及精制方法进行了研究,结果为10倍量700ml/L乙醇,回流提取2次,每次1h,为高山红景天的最佳提取工艺。王洋等<sup>[84]</sup>研究了乙醇体积分数、提取温度和提取时间对红景天甙提取率的影响,结果表明,乙醇体积分数对酪醇提取率的影响最大,蒸馏水(0%乙醇)为最佳提取溶剂。刘莱等<sup>[85]</sup>对红景天的提取工艺进行了优化试验,用正交法设计,高效液相色谱测定提取物中红景天甙含量,确认最佳提取方案为:药材8倍量的水,2h/次提取3次。

### 7.2.2 微波辅助提取法

王维等<sup>[86]</sup>利用微波辅助水提取,结合大孔吸附树脂分离红景天甙的制备工艺,获得了较高纯度的红景天甙,试验证明通过微波提取的红景天甙产量明显高于溶剂提取,红景天甙的收得率可达0.406%,提取率78.7%。赵武奇等<sup>[87]</sup>用红景天粉为原料,以水为溶剂用微波法提取红景天甙的最佳工艺参数为:液固比20:1,浸泡时间1.5h,低功率微波处理60s,磁力搅拌15min,提取2次,提取率为90%。

### 7.2.3 超声波提取法

吴少雄等<sup>[88]</sup>用超声波法提取红景天有效成分,最佳提取条件为:水为溶剂,固液比1:10,提取时间60min,红景天甙的提取率为76.11%。

### 7.2.4 通过酪醇合成或制备红景天甙

由于现阶段酪醇的工业化生产方法已经比较成熟,因此成本比较低,纯度为99%的酪醇每千克价格为人民币76元,而纯度为98%以上的红景天甙大部分作为标准品销售,每20mg价格都在人民币100元以上,则每千克高纯度红景天甙的售价要在人民币500万元以上。因此很多科研工作者致力于酪醇转化生产红景天甙的方法,其中包括合成法、微生物转化法、植物生物反应器等方法。例如:吴金龙等人<sup>[89]</sup>公开了一种化学合成红景天甙的专利,其步骤为由路易斯酸催化五乙酰-D-葡萄糖和对羟基苯乙醇在有机溶剂中糖甙化反应生成四乙酰基红景天甙,然后四乙酰基红景天甙在NaOCH<sub>3</sub>的甲醇溶液中脱去乙酰基得到红景天甙。王梦亮等<sup>[90]</sup>人进行了微生物催化D-葡萄糖与酪醇葡萄糖基转移合成红景天甙的初步研究,他们从红景天根系土壤中筛选出了一株米曲霉(*Aspergillus oryzae*),能够以D-葡萄糖和酪醇为底物催化生成红景天甙,最高产量为0.7g/L。本研究室则一直致力于利用生物技术方法制备红景天甙:利用基因工程方法提高野生植株中合成红景天甙合成途径中的关键酶——酪醇糖基转移酶、酪氨酸脱羧酶、苯丙氨酸解氨酶等酶的表达量来提高植株中红景天甙的含量<sup>[91]</sup>,并进一步通过悬浮细胞培养或是发根培养等方法制备红景天甙。

## 8 红景天产品的开发

### 8.1 红景天功能食品的开发

目前,红景天饮料的开发,包括调配饮料、发酵饮料、固体饮料,许多人做了有益的尝试。另外,刘志伟<sup>[92]</sup>提取红景天有效成分,应用于面包生产中。试验结果表明,在小麦粉中添加含功能因子红景天甙的红景天提取物,对面包的感官质量无不良影响并赋予产品特有的植物清香味感,且可一定程度上增加面包的持水性,保持鲜度,延缓老化。面包中含红景天甙功能因子,使得面包成为新型的功能食品,适合于脑力劳动强度高的学生、知识分子、重体力劳动者及运动员、飞行员,以及高原、深海、沙漠、微波辐射等特殊恶劣环境下工作的人员食用。

目前,国内已有几家公司开发红景天保健食品上市。其中较为成功的是北京红景天技术开发公司开发的圣莲红景天系列保健食品,包括红景天茶、红景天胶囊、红景天补酒、红景天饮料等。

### 8.2 红景天中药制剂及化妆品的开发

红景天在临床上表现出多种防治疾病与保健的功能,故以红景天为原料研究开发出了多