植物学通报 2005, 22 (5): 584~589
Chinese Bulletin of Botany

实 验 简 报

不同种源喜树幼枝中喜树碱的含量①

王玲丽 刘文哲②

(西北大学生命科学学院 西安 710069)

摘要 通过HPLC测定了喜树(*Camptotheca acuminata*)不同器官及不同种源幼枝中喜树碱的含量。结果表明, 喜树碱含量在叶、种子和幼枝(幼叶和幼茎)中较高, 木质部中较少, 髓中最低。不同种源的幼枝中, 来自成都种源喜树的喜树碱含量最高。通过比较, 两年生喜树各器官中喜树碱含量普遍比一年生高, 幼枝中顶枝的喜树碱含量比侧枝高。

关键词 喜树, 喜树碱, 幼枝, 种源

Contents of Camptothecin in *Camptotheca acuminata* from Different Provenances

WANG Ling-Li LIU Wen-Zhe②

(*College of Life Science, Northwest University*, Xi'an 710069)

Abstract Camptothecin (CPT) content in organs of *Camptotheca acuminata* and young shoots from different areas of China was determined by HPLC. CPT content in leaves, seeds and young shoots was higher than that in xylem, lowest in piths and highest in young shoots from Sichuan province. CPT content in young biennial shoots was higher than that in annual shoots and that in caulody was higher than that in subbranches.

Key words *Camptotheca acuminata*, Camptothecin, Young shoot , Provenance

喜树(*Camptotheca acuminata*), 为珙桐科(Nyssaceae)喜树属多年生亚热带落叶阔叶乔木, 是我国特有树种, 主要分布在长江流域及西南各省(中国科学院中国植物志编辑委员会, 1983)。该树种因富含抗癌和抗逆转录病毒的喜树碱(camptothecin, CPT)而深得植物学界和医药学界的关注。CPT首次是从喜树皮部中被分离出来的一种生物碱(Wall *et al.*, 1966), 后经证实该生物碱是通过抑制拓扑异构酶Ⅰ(topoisomerase Ⅰ, topo Ⅰ)发挥细胞毒性的天然植物活性成分(Hsiang *et al.*, 1985; Fortune *et al.*, 1999)。topo Ⅰ是一种与细胞分裂密切相关的酶, 阻断该酶的产生即可阻止癌细胞的生长(Kjeldsen *et al.*, 1992)。CPT独特的抗癌机理引起了喜树碱抗癌研究的新热潮, 目前已有4种以CPT为前体合成的喜树碱衍生物CPT-11 (irinotecan)、TPT (topotecan)、9-AC (9-aminocamptothecin) 及9-NC (9-

①陕西省教育厅产业化培育项目(03JC39)和西北大学科研基金项目(02NW10)资助。
②通讯作者。Author for correspondence. E-mail: lwenzhe@nwu.edu.cn
收稿日期: 2004-12-19 接受日期: 2005-02-28 责任编辑: 于昕

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-202

nitrocamptothecin) 获得美国食品和药物管理局(FDA)批准, 用于临床治疗结肠癌、直肠癌和复发性卵巢癌(Greemers *et al.*, 1996; Lorence and Nessler, 2004)。同时其他喜树碱衍生物正在进行临床前的筛选工作。另外发现一些喜树碱衍生物同时具有抗肿瘤和抗病毒双重功效。喜树碱及喜树碱衍生物已成为继紫杉醇后的第二种木本类抗肿瘤药, 其开发和研究方兴未艾。

喜树各器官中均含有喜树碱, 且不同器官及同一器官在不同发育时期, CPT的含量差异显著(Liu and Adams, 1996; Liu *et al.*, 1998), 但不同研究者结果并不一致。早期的研究认为果实中喜树碱的含量高(冯建灿等, 2000), 近年的研究表明, 越是幼嫩的组织如幼叶、幼枝, CPT 含量越高。已有报道喜树从生长点到第8片叶组成的茎尖中CPT的平均含量是整个植物地上部分材料平均含量的 4 倍(Liu *et al.*, 1998)。刘文哲等(2004)对喜树幼枝中喜树碱积累及其组织内定位研究表明, 幼枝因其CPT含量高、产量大以及可重复采收等优点, 可作为CPT生产的原料, 但至今尚未有不同种源地喜树幼枝中 CPT 含量比较的报道。本文在比较了幼枝与其他器官CPT含量的基础上, 还比较了来自14个不同种源地喜树实生苗幼枝中CPT含量及变化, 为筛选CPT含量高且产量大的原料及筛选喜树优良种源, 并进一步实现 CPT 生产产业化提供一定的科学依据。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪, SENCOR系列旋转蒸发仪, SHB-III循环水式多用真空泵, DL-180超声波破碎仪, MA200型电子分析天平, Centrifuge 5804 R离心机, 78-1型磁力加热搅拌器, DZKW-4型恒温水浴锅。

色谱纯甲醇, 分析纯甲醇, 分析纯二氯甲烷, 蒸馏水。喜树碱标准品(99.8%)由德国 Boehringer Ingelheim制药公司Bischoff教授惠赠。

1.2 材料

各产地喜树(*Camptotheca acuminata*)种子分别于 2002 和 2003 年 11 月采集于四川成都、陕西西安、贵州六盘水、湖南吉首、上海、福建武夷山、湖北武汉、广东广州、云南昆明、江西九江、安徽合肥和浙江的杭州、金华、磐安。不同产地的喜树种子分别于2003和2004年4月种植在西北大学生物园的同一片实验地里。

不同种源喜树幼枝于2004年10月取于所种喜树实生苗, 随机选取每个种源地实生苗5株, 取第5节以上的幼枝。不同器官的材料分别取自所种的二年生西安树种, 因喜树开花结果期为10年, 所以果实和种子于2004年11月采于西安植物园的喜树母株。

1.3 喜树碱的提取

将所取材料经60 ℃烘箱干燥至恒重, 粉碎过60目筛后, 精确称取其粉末各100 mg, 置于离心管中加4 mL甲醇, 超声波提取10分钟后, 加30 mL蒸馏水, 40 mL二氯甲烷, 用磁力搅拌器充分混合 5 分钟后, 448 *g* 离心机离心 10 分钟, 产生两相, 收集有机相, 减压蒸发至干燥 (van Hengel *et al.*, 1992), 剩余部分溶解在1 mL色谱纯甲醇中, 用于喜树碱含量的测定。

1.4 喜树碱含量的HPLC分析

1.4.1 色谱条件 色谱VP-ODS柱(150 L × 4.6); 流动相: 甲醇/水(v/v, 62/38); 流速: 1 mL·min^{-1}; 检测波长: 254 nm; 进样量: 10 μL; 柱温: 25 ℃。在该色谱条件下喜树碱标准品和样品的色谱图见图 1。

1.4.2 标准溶液的配制 精确称取喜树碱标准品2.5 mg于50 mL容量瓶中, 加入色谱纯甲醇, 超声波助溶后定容至刻度, 摇匀备用。

1.4.3 标准曲线的绘制 分别精确量取喜树碱标准溶液 2、3、5、8 和 10 mL 于 10 mL 的容量瓶中, 用色谱纯甲醇分别稀释并定容至刻度。摇匀后按照上述色谱条件分别取稀释后的标准溶液样品进样分析, 每样重复3次, 取

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-202

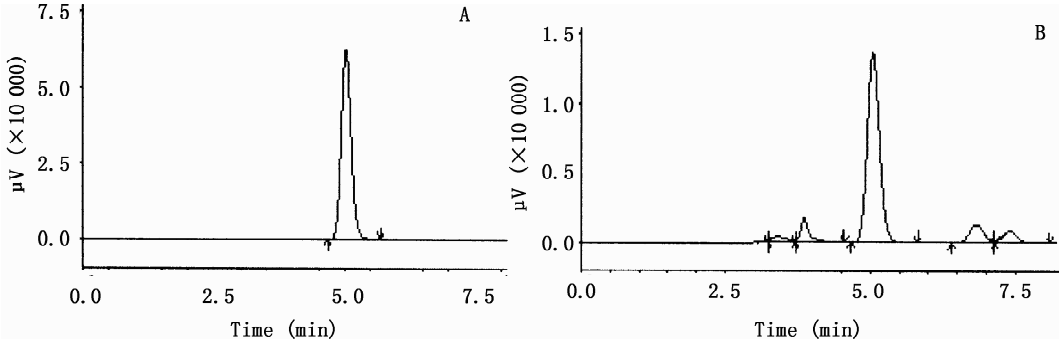

图1 喜树碱标准品(A)及喜树幼枝样品提取物(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standard Camptothecin (CPT) (A) and extract from young shoots of *Camptotheca acuminata* (B)

3次峰面积的平均值。得峰面积Y与喜树碱溶液浓度X(μg·mL^{-1})的线性回归方程为: Y=16 686X－6 577.5,相关系数R^2=0.999 3。

1.4.4 精密度测定 分别取标准溶液10 μL, 连续进样3次, 测得峰面积分别为834 094.9、835 961.1和838 311.0, 根据其平均值和标准差求得RSD为0.253%, 说明精密度较好。

1.4.5 CPT含量的计算 将样品按照上述色谱条件分别进样分析, 每样重复3次, 取3次峰面积的平均值, 根据线性回归方程求出样品中CPT浓度, 由提取液体积(1 mL)及喜树材料质量(100 mg)可求得材料中CPT的百分含量。

2 结果与分析

2.1 不同器官中喜树碱含量

从图2中看到, CPT含量以幼叶、种子和幼枝中较高, 分别为0.185%、0.172%和0.159%, 与其他器官相比差异显著(P<0.01)。木质部中CPT含量较少, 髓中含量最少。幼叶中CPT含量虽然最高, 但过多的采集会减少光合作用从而影响植株的生长。种子因材料有限, 每年只能收集一次而不能为CPT生产提供大量原料。幼枝中CPT含量较高且产量大、不受季节限制、可重复采收及采收过程简单, 所以可通过产业化生产大量的喜树幼枝, 为提取喜树碱提供大量的、高CPT含量的原料。为此, 我们比较了不同种源地喜树幼枝中CPT的含量以筛选优良的种源。

2.2 不同种源喜树幼枝中喜树碱含量

从图3中看出, 不同种源的一年生喜树幼枝中CPT含量有明显差异, 四川成都所产的喜树幼枝中CPT含量最高, 为0.163%。福建和上海所产的喜树幼枝中CPT含量较高, 与四川种源相差不大, 与其他7个产地相比差异显著(P<0.01)。安徽合肥所产的喜树幼枝中CPT含量最低, 为0.034%。不同产地的二年生喜树幼枝中喜树碱含量差异不大, 其中仍以四川成都所产的喜树幼枝中CPT含量最高, 为0.174%(图4)。已有文献报道喜树果实和喜树叶中均以四川喜树所产的CPT含量最高(张玉红, 2002; 张玉红和祖元刚, 2003), 王自芬和刘文哲(2005)对喜树果实中CPT及10-OH-CPT含量的产地差异分析也表明四川喜树所产的CPT含量最高。

从不同种源地一年生和二年生喜树幼枝中CPT的含量变化分析看来, 一年生喜树中各种源地CPT含量差异显著, 二年生幼枝中除广州和杭州种源的CPT含量较低外, 其他种源地含量差异不显著。表明喜树碱代谢除受遗传因素控制外, 可能不是严格地受控于喜树的生

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-202

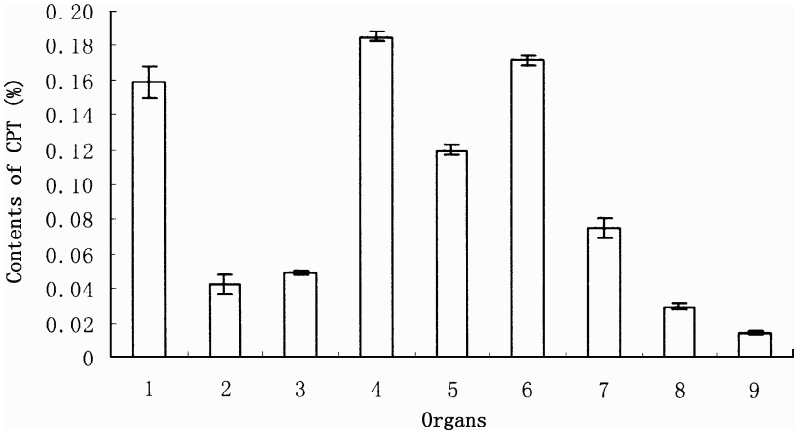

图 2 不同器官中喜树碱含量

1. **幼枝**; 2. **根**; 3. **茎**; 4. **幼叶**; 5. **果实**; 6. **种子**; 7. **皮部**; 8. **木质部**; 9. **髓**

Fig. 2 Camptothecin(CPT) contents in different organs

1. Young shoot; 2. Root; 3. Stem; 4. Young leaf; 5. Fruit; 6. Seed; 7. Bark; 8. Xylem; 9. Pith

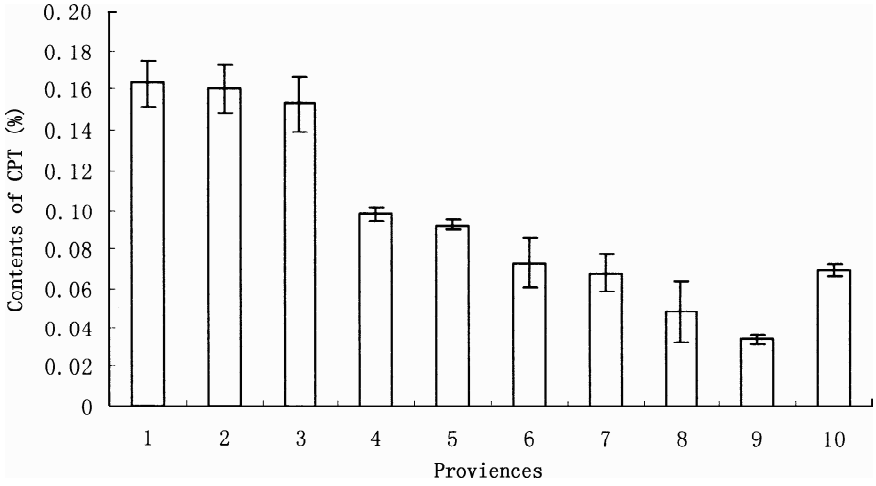

图 3 一年生喜树不同种源幼枝中喜树碱含量

1. **成都**; 2. **上海**; 3. **武夷山**; 4. **昆明**; 5. **金华**; 6. **西安**; 7. **广州**; 8. **武汉**; 9. **合肥**; 10. **吉首**

Fig. 3 Camptothecin(CPT) content in young shoot of annual *Camptotheca acuminata* from different provenances

1. Chengdu; 2. Shanghai; 3. Wuyishang; 4. Kunming; 5. Jinhua; 6. Xi'an; 7. Guangzhou; 8. Wuhan; 9. Hefei; 10. Jishou

育节律, 而是更主要地受到季节变化过程中环境因素变化的影响(王洋等, 2004)。**自然生长的喜树植株, 叶片中喜树碱含量的季节变化与气温、降雨量和蒸发量有很密切的关系**(Yan *et al.*, 2003),**这也说明喜树碱的代谢确实是响应于多种环境因素变化的(王洋等**, 2004)。

通过对照图3**和图**4**可知二年生喜树幼枝所含喜树碱含量普遍比一年生高。同时我们也比较了一年生和二年生喜树的其他器官中** CPT **含量。结果发现, 二年生的根、茎、叶中**CPT**含量也高于一年生的(图**5), **其差异显著(**P<0.05)。**不同树龄喜树叶片中** CPT **含量**

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-202

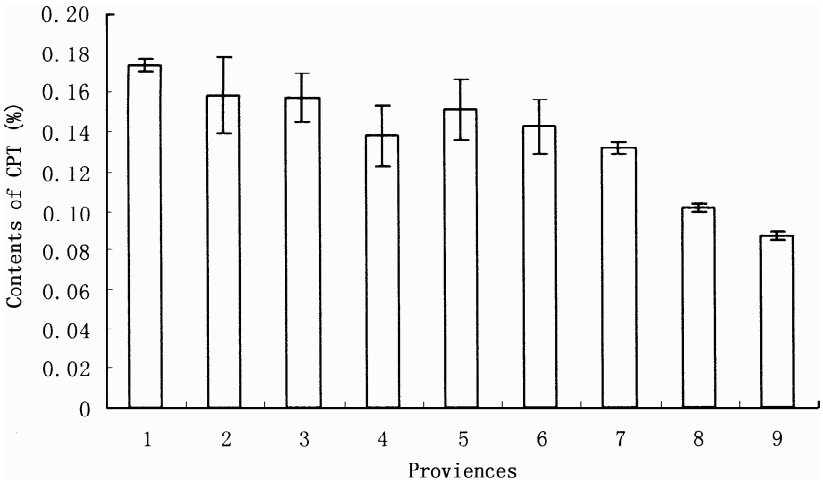

图 4　二年生喜树不同种源幼枝中喜树碱含量

1. **成都**; 2. **西安**; 3. **吉首**; 4. **六盘水**; 5. **磐安**; 6. **金华**; 7. **九江**; 8. **广州**; 9. **杭州**

Fig. 4　Camptothecin(CPT) content in young shoot of biennial *Camptotheca acuminata* from different provenances

1. Chengdu; 2. Xi'an; 3. Jishou; 4. Liupanshui; 5. Panan; 6. Jinhua; 7. Jiujiang; 8. Guangzhou; 9. Hangzhou

亦不相同, 二年生树叶片中CPT**的含量是三年生树叶片含量的** 2 **倍、是四年生的** 16 **倍**(Liu *et al.*, 1998)**。但没有一年生和二年生喜树的** CPT **含量关系。**Li (2002) **报道** 1~8 **年生的喜树树龄不是影响幼嫩组织中喜树碱含量的直接因素, 但从其研究结果可知, 四年生以前随着树龄的增加幼叶中**CPT**含量也随着增加, 四年生以后随着树龄的增加** CPT **含量有所下降, 说明二年生幼叶中** CPT **含量也高于一年生。我们认为一年生喜树组织非常幼嫩, 主要进行初生代谢, 其生物量及次生代谢活动都比较低。而二年生植株生物量大, 次生代谢旺盛, 生物碱也积累较多。**

在比较不同种源喜树幼枝中CPT**含量差异的同时, 我们随机取了一年生**4**个种源的幼枝将其顶枝和侧枝分开, 分别比较顶枝和侧枝**

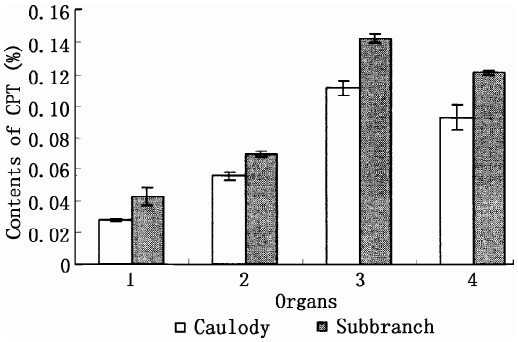

图 5　一年生和二年生喜树各器官中喜树碱含量

1. **根**; 2. **茎**; 3. **叶**; 4. **幼枝**

Fig. 5　Camptothecin (CPT) contents in different organs of annual and biennial *Camptotheca acuminata*

1. Root; 2. Stem; 3. Leaf; 4. Young shoot

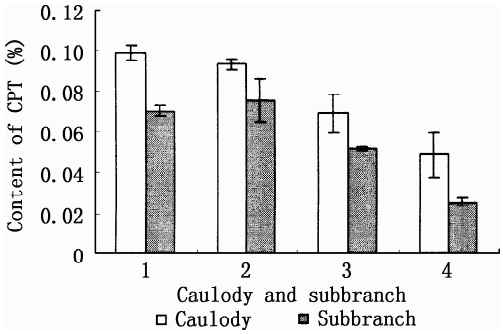

图 6　不同种源顶枝和侧枝的喜树碱含量

1. **昆明**; 2. **金华**; 3. **广州**; 4. **武汉**

Fig. 6　Camptothecin(CPT) contents in caulody and subbranch from different provenances

1. Kunming; 2. Jinhua; 3. Guangzhou; 4. Wuhan

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-202

中CPT的含量, 结果发现, 不同种源的喜树, 各顶枝中CPT含量都比侧枝的含量高(图6), 且差异显著($P < 0.05$)。这表明, 越靠近树的顶部, 喜树碱含量越高(Liu *et al.*, 1998)。

喜树幼枝中CPT含量高, 产量大, 易于采收且不受季节限制, 可成为生产CPT的主要原料。通过不同产地幼枝中CPT含量分析可知, 四川种源可作为CPT生产产业化的优良品系。另外二年生喜树比一年生更适合用来作为CPT提取的原料。

参 考 文 献

冯建灿, 张玉洁, 谭运德, 张文杰 (2000) 喜树与喜树碱开发利用进展. 林业科学, **36(5):** 100-108

刘文哲, 王自芬 (2004) 喜树幼枝的喜树碱积累及其组织内定位. 植物生理与分子生物学学报, **30:** 405-412

王洋, 戴绍军, 阎秀峰 (2004) 光强对喜树幼苗叶片次生代谢产物喜树碱的影响. 生态学报, **24:** 1118-1122

王自芬, 刘文哲 (2005) 喜树果实中喜树碱及10-羟基喜树碱的差异. 中草药, **36:** 762-763

张玉红 (2002) 喜树果实中喜树碱含量的产地差异及季节变化. 东北林业大学学报, **30(6):** 44-46

张玉红, 祖元刚 (2003) 不同产地和生长季节喜树叶中喜树碱含量测定. 植物学通报, **20:** 572-575

中国科学院中国植物志编辑委员会 (1983) 中国植物志(第52卷2分册). 科学出版社, 北京, pp. 144-147

Fortune JM, Graves DE, Utsugi T, Yamada Y, Osheroff N (1999) DNA Topoisomerases as targets for the anticancer drug TAS-103: DNA interactions and topoisomerase catalytic inhibition. *Biochemistry*, **38:** 15580-15586

Greemers JP, Despas R, Favalli G, Kreinberg R, Vanbelle S, Hudson I, Verweiij J, Huinink WW (1996) Topotecan,an active drug in the second-line treatment of epithelial ovarian cancer:results of a large European phase Ⅱ study. *Journal of Clinical Oncology*, **14:** 3056-3061

Hsiang YH, Herizberg R, Hecht S, Liu LF (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase Ⅰ. *Journal of Biological Chemistry*, **260:** 14873-14878

Kjeldsen E, Svejstrup JQ, Gromova II, Alsner J, Westergaard O (1992) Camptothecin inhibits both the cleavage and religation reactions of eukaryotic DNA topoisomerase Ⅰ. *Journal of Molecular Biology*, **228:** 1025-1030

Liu Z, Adams J (1996) Camptothecin yield and distribution within *Camptotheca acuminata* trees cultivated in Louisiana. *Canadian Journal of Botany*, **74:** 360-365

Liu Z, Carpenter SB, Bourgeois WJ, Yu Y, Constantin RJ, Falcon MJ, Adams JC (1998) Variation in the secondary metabolite Camptothecin in relation to tissue age and season in *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). *Tree Physiology*, **18:** 265-270

Li SY, Yi YJ, Wang YJ, Zhang ZZ, Beasley RS (2002) Camptothecin accumulation and variations in *Camptotheca*. *Planta Medica*, **68:** 1010-1016

Lorence A, Nessler CL (2004) Camptothecin, over four decades of surprising findings. *Phytochemistry*, **65:** 2735-2749

van Hengel AJ, Harkes MP, Wichers HJ, Hesselink PGM, Buitelaar RM (1992) Characterization of callus formation and camptothecin production by cell lines of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell, Tissure and Organ Culture*, **28:** 11-18

Wall ME, Wani MC, Cooke CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA (1966) Plant antitumor agents Ⅰ. The isolation and structure of camptothecin,a novel alkaloidal leukaemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *Journal of the American Chemical Society*, **88:** 3888-3890

Yan XF, Wang Y, Yu T, Zhang YH, Dai SJ (2003) Variation in camptothecin content in *Camptotheca acuminata* leaves. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **44:** 99-105

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-202