

# 药用植物东革阿里的研究进展<sup>\*</sup>

凌敏<sup>1,2</sup> 何春梅<sup>1</sup> 高健敏<sup>1,2</sup> 王洪峰<sup>1</sup>

(1. 广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405)

**摘要** 东革阿里广泛分布于东南亚,是具有抗癌、抗疟疾、改善男性性功能障碍等作用的药用植物。文章主要从植物生物学和生态学特征、化学成分、药理作用、繁殖技术、次生代谢产品的生产等5个方面对其近年来的研究进展进行了综述,并对今后的研究方向进行了展望。

**关键词** 东革阿里;化学成分;药理作用;繁殖;次生代谢产物

中图分类号:S792 文献标识码:A 文章编号:1006-4427(2013)06-0066-08

## Research Progresses on *Eurycoma longifolia*

LING Min<sup>1,2</sup> HE Chunmei<sup>1</sup> GAO Jianmin<sup>1,2</sup> WANG Hongfeng<sup>1</sup>

(1. Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong 510520, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China)

**Abstract** *Eurycoma longifolia* is a kind of medicinal plant which can be used for its unique anticancer, antimalarial properties and improve the male sexual function in Southeast Asia. New progresses on *E. longifolia* around the world were reviewed, mainly including plant biological and ecological characteristics, chemical composition, pharmacological action, cultivation, secondary metabolites production, and study trends in the future.

**Key words** *Eurycoma longifolia*; chemical composition; pharmacological activity; cultivation; secondary metabolites

东革阿里(*Eurycoma longifolia*)为苦木科(Simaroubaceae)东革阿里属(*Eurycoma*)植物,在原产地被称为马来西亚人参、乡土人参、天然伟哥等,常以根入药,具有抗癌、抗疟疾、改善男性性功能障碍等功效,在印度尼西亚、越南、马来西亚等东南亚国家广泛分布。东革阿里与燕窝、锡器一起并称为马来西亚三大国宝。此外,其萃取物还具有提升体力、减轻疲劳、杀菌、抗溃疡、降血压及治疗糖尿病等多种功效,是东南亚最珍贵的应用植物药之一<sup>[1]</sup>。本综述将主要针对东革阿里的化学成分、药理活性和繁殖技术的研究进展作一个综合性的概述。

## 1 东革阿里的生物学和生态学特征

### 1.1 生物学特征

东革阿里为常绿乔木,高4~6 m,最高可达18 m,主干无分枝,雌雄异株。叶近革质,奇数羽状复叶,螺旋状排列于树干顶端,长20~40 cm。叶柄基部膨大,脱落后叶痕明显。小叶5~15对,对生,倒卵状披针形,无柄或近无柄。圆锥花序腋生,花小,花瓣5,分离。核果,椭圆形或圆形,长1~3 cm,宽0.5~1.2 cm,绿

\* 基金项目:国家林业局“948”项目“珍贵林下药用植物东革阿里种质资源及栽培技术引进”(2012-4-53)。

第一作者:凌敏(1990-),在读硕士研究生,主要从事中药保健品开发研究,E-mail:lemongrasstome@163.com。

通信作者:王洪峰(1969-),教授级高级工程师,主要从事珍贵药食两用植物定向培育研究,E-mail:whfgd@263.net。

色,成熟后红至黑色,味极苦。根不分叉,入地最深可达2 m。花期6—7月,果期8—9月。

东革阿里全株均可入药,但药用部分主要来源于根部,在东南亚民间作为传统药材和滋补品已有数百年历史,既可作单味药、也可作药方中的重要配药。迄今为止,被当做药材东革阿里使用的原植物有 *E. longifolia*、*E. longifolia* subsp. *eglandulosa*、*Entomophthora apiculata*、*Polyathia bullata* 等<sup>[2-4]</sup>,这几种植物在形态方面存在不同程度的差异,虽然都有一些相似的功效,但是最常用并被广泛认可的是 *E. longifolia*。

东革阿里在自然环境中通过种子繁殖,种子发芽率低且萌发所需时间长,发芽后的植株生长缓慢,栽培2~3 a才结少量果,成熟期一般为5 a以上,达到完全成熟期大概需要25 a。因此,东革阿里野生资源的再生不能满足市场的大量需求。大部分东革阿里栽培4 a后即采收根,用于商业用途。

## 1.2 生态学特征

东革阿里主要分布于马来西亚、印度尼西亚和越南等东南亚国家,柬埔寨、缅甸、泰国、老挝、菲律宾及新加坡等也有零星分布。适宜的生态环境为潮湿的酸性砂质土壤,多生于海拔700 m以下的海滩林、原生或次生林中,常与龙脑香(Dipterocarpaceae)林或杜鹃(Ericaceae)林混生。

Asiah等<sup>[5]</sup>利用SNP分子标记技术对东革阿里遗传多样性进行了初步研究,采用马来西亚5个地理种群,分别是岛屿种群Langkawi、人工栽培种群Meiaka、海边种群Johor、低陆种群Pahang和山林种群Terengganu,结果表明东革阿里具有较高的遗传多样性,SNP分子标记可有效鉴别东革阿里个体起源,为该植物的繁殖、引种驯化、种植及保育提供了一些基本信息。虽然遗传多样性并不是限制东革阿里生长的首要条件,但是随着野生东革阿里生境被人为干扰破碎化程度加剧,以基因流作为主要控制因素的居群间的遗传结构很可能因地理位置的增大而产生较大差异,最终形成生殖屏障而阻断区群间的基因交流,导致遗传多样性下降。因此,对东革阿里的原生生境进行保护、禁止砍伐是保护的首要内容,同时在迁地保护时应尽可能多地从不同生长区引种,从而最大限度地保持其遗传多样性。

## 2 化学成分

东革阿里属于苦木科植物,该科植物在全世界有200多种,东革阿里由于具有显著的抗癌、抗疟疾功效,引起了广泛关注。从东革阿里不同器官中分离出来的化学成分以quassinoid骨架的二萜类与canthin-6-one类生物碱为主,如eurycomaoside, eurycolactone, eurycomalactone, eurycomanone和pasakbumin-B。此外,还含有联苯木质素、角鲨烯衍生物等。

### 2.1 萜类

东革阿里含有的萜类成分主要是以quassinoid骨架的二萜类居多,通过三萜降解途径合成,在根和叶中都有发现。Jiwajinda等<sup>[6]</sup>从东革阿里叶中分离出7种苦木味素类化合物,分别为lonilactone、6-dehydrolo-nilactone、11-dehydroklaineaneone、12-epi-dehydroklaineaneone、15 $\beta$ -hydroxyklaineaneone、14, 15 $\beta$ -dihydroxyklaineaneone、15- $\beta$ -O-acetyl-14-hydroxyklaineaneone,此类化合物具有抗癌和抗寄生虫作用。Tada等<sup>[7]</sup>在东革阿里根中分离出4种苦木味素: pasak bumin-A、pasak bumin-B、pasak bumin-C和pasak bumin-D,其中pasak bumin-A(eurycomanone)和pasak bumin-B具有抗溃疡的作用。Hou等<sup>[8]</sup>在东革阿里中还发现了一个新的甘遂烷型三萜化合物23,24,25-trihydroxytirucall-7-en-3,6-dione。Chan等<sup>[9]</sup>从东革阿里根中提取得到了一个苦木素糖苷eurycomanol-2-O- $\beta$ -Dglycopyranoside,研究表明具有抗疟效果。Kuo等<sup>[10]</sup>第一次分离得到4种苦木素二萜类化合物: eurycomalide A、eurycomalide B、13 $\beta$ , 21-dihydroxyeurycomanol和5 $\alpha$ , 14 $\beta$ , 15 $\beta$ -trihydroxyklaineaneone。

### 2.2 生物碱

东革阿里体内的生物碱以canthin-6-one类生物碱为主,在根、茎、枝条中都有发现。Mitsunaga等<sup>[11]</sup>从东革阿里茎段和枝条中分离得到5种新的canthin-6-one生物碱: 9,10-dimethoxycanthin-6-one、10-hydroxy-9-methoxycanthin-6-one、11-hydroxy-10-methoxycanthin-6-one、5,9-dimethoxycanthin-6-one及9-methoxy-3-methylcanthin-5,6-dione,其生物活性还有待进一步研究。Hou等<sup>[8]</sup>在东革阿里根提取物分离中得到2种新型的canthin-6-one生物碱,分别为4,9-dimethoxy-canthin-6-one和10-hydroxy-11-methoxycanthin-6-one。

### 2.3 挥发性物质

Shafiqul等<sup>[12]</sup>应用气质联用技术成功地从东革阿里不同部位的粉末和粗提物中分离得到9种挥发性物质,分别为: curcumene、massoilactone、3-Phenoxy-1-propanol、octanoic acid、benzoic、acetic acids、menthol、2-Phenoxyethanol、4-Ethynyl-4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-2-cyclohex-1-enone。这是首次有学者将东革阿里中的挥发性

物质分离出来进行分析,但目前还没有人对它们进行生物活性检测。

## 2.4 其它类

韩凌飞等<sup>[13]</sup>采用反复硅胶柱色谱法和 Sephadex LH-20 柱色谱法从东革阿里根的水提物中分离得到 5 种化合物,并通过波谱分析技术分别鉴定为: scopoletin、9-methoxycanthin-6-one、7-methoxy- $\beta$ -carboline-1-propionic acid、laurycolactone A、7-methoxyinfractin,其中 7-methoxyinfractin 为新化合物。

# 3 药理作用

## 3.1 抗癌活性

东革阿里具有抗癌作用最早报道于 1990 年, Morita 等<sup>[14]</sup>研究发现由东革阿里根中所纯化得到的 longilactone、13,21-dihydroeurycomanone、14,15-dihydroxyklaineaneone 对 KB 与 P-388 癌细胞株具有细胞毒活性,其  $IC_{50}$  分别为 3.40, 0.33, 0.38  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (KB) 及 1.30, 1.20, 0.29  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (P-388)。Kardono 等<sup>[15]</sup>将东革阿里根中分离得到的 9-methoxy-canthin-6-one、9-methoxy-canthin-6-one N-oxide、9-hydroxycanthin-6-one、9-hydroxycanthin-6-one N-oxide、eurycomanone 5 种化合物对 8 种不同的人体癌细胞株进行细胞毒活性试验,结果除 KB 癌细胞之外,上述 5 个化合物都显示中等强度以上的细胞毒活性。Morita 等<sup>[16]</sup>于 1993 年再次报导所分离得到的化合物 6-dehydroxy longilactone、7 $\alpha$ -hydroxyeurycomalactone、12-acetyl-13,21-dihydroeurycomanone 对于 P-388 癌细胞株具有很强的细胞毒活性,其  $IC_{50}$  分别为 0.66, 0.11, 0.94  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 而化合物 14-deacetyleurylene 与 eurylene 的水解产物 11-deacetyleurytene 对于 KB 癌细胞株具有很强的细胞毒活性,其  $IC_{50}$  分别为 0.52 和 3.30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Kuo 等<sup>[17-18]</sup>从东革阿里根中提取了 65 个化合物并对其研究发现,其中有 7 个对 MCF-7 肿瘤细胞有显著的细胞毒活性,8 个对肺癌 A549 肿瘤细胞有强烈的细胞毒活性,其  $IC_{50}$  都低于 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Tee 等<sup>[19]</sup>试图寻找此类活性化合物的作用机制,发现东革阿里粗提物能通过细胞凋亡蛋白酶的作用诱导细胞凋亡,从而抑制 MCF-5 肿瘤细胞生长。另外有学者报道富含 eurycomenone 的东革阿里根提取物能通过 P53 通路诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡<sup>[20]</sup>。Pooi-Fong 等<sup>[21]</sup>研究发现, eurycomanone 能通过抑制肺癌细胞抑制素蛋白、膜联蛋白和内质网蛋白 28 这 3 种蛋白的表达从而达到抗癌效果。

## 3.2 抗疟活性

Chan 等<sup>[22]</sup>研究发现东革阿里的甲醇粗提取物的氯仿部分和正丁醇部分具有抗疟活性,  $IC_{50}$  介于 0.05 ~ 0.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之间; 所分离得到的纯化合物中, eurycomalactone、eurycomanone、eurycomanol 具有与氯喹 ( $IC_{50} = 20.21 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 相近或更强的疟原虫抑制活性,其  $IC_{50}$  分别为 0.21, 0.11, 0.28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Kuo 等<sup>[23]</sup>也报导了 eurycomanone、pasakbumin B 比氯喹具有更强的疟原虫抑制活性。其作用机理为东革阿里根提取物中 quassinoids 类化合物能抑制疟原虫体内蛋白质的合成,从而达到抗疟的作用<sup>[24]</sup>。

## 3.3 改善性功能

Ang 等<sup>[25-26]</sup>给已具有性经验的成年小鼠喂食东革阿里的粗提取物后,小鼠各项性功能指标均有所提高,而不具有性经验的成年小鼠经喂食粗提取物后,有性欲现象产生,说明其具有诱导性欲和提高性欲的作用。Lin 等<sup>[27]</sup>研究发现东革阿里的乙醇粗提取物会降低基础睾酮的释放,但会使人类绒毛膜促性腺激素诱导小鼠睾丸间质细胞分泌睾酮的增加。Wahab 等<sup>[28]</sup>给经雌性激素处理过的大鼠连续灌胃东革阿里提取物 14 d,发现其也能促进大鼠精子生成,提高血清睾酮水平。Solomon 等<sup>[29]</sup>给大鼠灌胃东革阿里的水浸提取物 14 d,除了观察精子数目和睾酮浓度,对睾丸、附睾、前列腺、腓肠肌、网膜等器官服药前后的重量也进行了对比,并对精子的运动性能、速率、活性、顶体反应以及线粒体膜电位 (MMP) 进行评估;结果显示,与对照相比,东革阿里水提物对各器官的重量没有影响,内膜脂肪降低了 31.9%,睾酮浓度增加了 30.2%,腓肠肌重量有所增加,但是不显著, MMP 显著增加 25.1%,精子的数目、动能、活性均显著增加。杜闻伟等<sup>[30]</sup>用去势手术制备阳虚模型,观察药物对去势大鼠的影响,结果发现东革阿里能显著缩短去势大鼠阴茎勃起潜伏期,增加性器官重量,使去势大鼠阴茎、提肛肌、精液囊和前列腺脏器指数提高,说明东革阿里具有一定的补肾壮阳作用。乔同岭<sup>[31]</sup>通过让大鼠进行 6 周力竭性游泳训练建立了运动性低血睾酮大鼠模型,再给予服用东革阿里和玛咖 (*Lepidium meyenii*),观察玛咖和东革阿里的促睾酮作用效果;结果显示,服用玛咖和东革阿里均可显著增强大鼠的耐力运动能力,延长其负重游泳力竭时间,可有效降低长时间力竭游泳训练大鼠血睾酮水平下降的幅度,改善运动性低血睾酮状,并且东革阿里的促睾酮作用效果好于玛咖。Low 等<sup>[32]</sup>研究发现东革阿里富含苦木素的提取物促进精子生成的机制是通过下丘脑垂体性腺轴来调节。随后,Low 等<sup>[33]</sup>将

东革阿里根中的活性成分 eurycomanone 提取出来,探讨其促睾酮活性,结果显示,eurycomanone 能够通过抑制睾丸间质细胞中的芳香酶转化为雌二醇,从而促进睾酮类固醇的生成,为治疗先天性睾酮不足引起的男性不育提供了一种新的植物药。

### 3.4 其它活性作用

除了上述的活性研究之外,东革阿里还有降血糖、抗菌、治疗痛风、骨质疏松等作用。Polonsky 等<sup>[34]</sup>发现东革阿里中化合物 shinjulactone C 具有抗 HIV 活性,EC<sub>50</sub> = 10.6 mmol/L。Husen 等<sup>[35]</sup>发现东革阿里能降低高血糖模型小鼠的血糖水平。Rajeev 等<sup>[1]</sup>报道每天吃东革阿里叶和根能控制血糖水平。Farouk 等<sup>[36]</sup>用甲醇、乙醇、丙酮和水 4 种不同溶剂对东革阿里的不同部位进行提取,观察各提取物对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的抗性发现,除了埃希式杆菌和伤寒杆菌 2 种革兰氏阴性菌外,叶和茎提取物都有一定的抗菌作用,同时叶的水提物对金黄色酿脓葡萄球菌和沙雷氏菌有强的抗菌活性,但是根提取物没有显示任何抗菌活性。Shuid 等<sup>[37]</sup>发现东革阿里根的萃取物能阻止睾丸切除的大鼠骨钙流失,因此认为它可以用于治疗雄性激素缺乏引起的骨质疏松症。史坤等<sup>[38]</sup>发现东革阿里提取物可以显著降低痛风性关节炎大鼠炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-8、NO 和 5-HT 的血清浓度及髓过氧化物酶的含量,在减轻关节肿胀、缓解痛感及抑制炎症发展方面有显著作用。Al-Salahi<sup>[39]</sup>等发现东革阿里对抑制血管新生有显著效果,其作用机制为东革阿里根提取物中含有大量的苦木素类化合物,经 HPLC 分析,主要为 eurycomanone、13 $\alpha$ (21)-epoxyeurycomanone 及 eurycomanol,能够抑制人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的增殖、变异与转移,从而抑制血管新生。Talbot 等<sup>[40]</sup>给 63 名经筛选的志愿者连续服用 4 周的东革阿里提取物,观察其压力及情绪变化;结果显示,人群焦虑、愤怒、疑虑分别降低了 11%、12%、15%;经压力荷尔蒙分析,唾液皮质醇暴露降低了 26%,睾酮增加了 37%,说明东革阿里有一定的缓解压力及调节心理情绪的作用。

## 4 繁殖技术

东革阿里是一种具有抗癌、抗疟、抗糖尿病等多功效的热带植物,主要分布在东南亚靠近赤道的原始热带雨林中,通常采取种子播种繁殖。同大部分兰科植物一样,东革阿里对生长环境要求比较苛刻,栽培比较困难。适宜的生境是酸性湿润且排水性良好的砂质土壤,同时需要部分遮荫。该植物的原生境仅限于热带丛林山坡中局部遮荫的山坳林冠,允许部分阳光直射的地带。正因为东革阿里特殊的生长环境,加上自身的生长特性,即使在它的原产地马来西亚,野生药材也十分稀缺,故极为昂贵。由于其药效显著,市场需求大,尤其是科研开发和药用生产需求大,东革阿里的野外采集通常连根拔起,导致各地野生的东革阿里种群不断消失。马来西亚政府已下令保护该植物,禁止开采野生东革阿里。目前,东革阿里的人工繁殖包括种子繁殖和组织培养 2 个方面。东革阿里通过种子萌发的常规繁殖方式不能满足如今的市场需求,这是因为植株自然生长缓慢,需要至少 5 a 才达到成熟,而结果率通常很低,并且东革阿里属于种子活力下降快、萌发率低、萌发所需时间长的顽拗性种子。因此,植物组织培养技术可作为一种提供东革阿里商业化种苗的有效方式。

目前报道组织培养方式有愈伤再生和体细胞再生 2 种方式。Singaram 等<sup>[41]</sup>在 1994 年就对东革阿里的组织培养进行过探索,采用植物的茎段作为外植体在 MS 基本培养基上进行愈伤诱导,探讨温度、光照、pH 值、激素等因素对愈伤诱导的影响,发现 MS + 2.0 mg/L NAA + 0.1 mg/L BA 培养基上诱导愈伤组织最成功,pH 值为 6.0 时最佳,环境温度为 35  $^{\circ}$ C、光照强度为 610 lx 时愈伤组织的产量达到最大。成功诱导东革阿里愈伤组织是接下来进行细胞培养和体外进行次生代谢产物生产的必要前提。Sobri 等<sup>[42]</sup>用子叶、合子胚、叶片、叶柄、茎、根作为外植体进行诱导,发现只有子叶能形成胚性愈伤组织,最适宜培养基为 MS + 0.5 mg/L KT + 1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 g/L 活性炭,在含有 1.0 mg/L KT 的 MS 培养基中进行继代培养,植株再生率达到 90%。Hussein 等<sup>[43]</sup>用茎尖作为外植体进行直接的植株再生,再生率最高达到 90%,在 MS + 5.0 mg/L KT 的培养基中生成大量丛生芽,最佳生根培养基为 MS + 0.5 mg/L IBA。Maziah 等<sup>[44]</sup>则探讨了 2,4-D、IAA、NAA、Picloram 和 Dicamba 等不同激素对东革阿里愈伤诱导的影响,外植体不同,所适宜的激素及其浓度有差别,综合评价,2,4-D 是东革阿里愈伤诱导最适宜的植物激素。Hassan 等<sup>[45]</sup>通过腋芽已经成功建立了东革阿里的微繁体系,种子在 MS 和 WPM 培养基中瓶内播种,2 周后开始萌发,3 ~ 5 周后长出更多的腋芽,在 WPM + 0.25 mg/L BAP 培养基中产生的芽最多,数量平均可达(2.75  $\pm$  0.50)个;芽增殖最适宜培养基为 MS + 0.5 mg/L BAP,芽的平均数量有(1.82  $\pm$  0.14)个;最适宜生根培养基为 1/2 MS + 10 mg/L IBA,平均每个芽上的生根数为(2.24  $\pm$  0.31)条,显著高于其他培养基中的生根数;当根长至 4 ~ 5 cm 时用无菌水洗去

多余的琼脂,移栽至沙与土比例为1:3的土壤中,1/2 MS + 1.0 mg/L IBA 培养基中的移栽苗成活率最高,为75%;虽然 IBA 浓度为10 mg/L 时生根最多,但不能保证植物的成活率,可能与根的维管系统发育不完全有关。

## 5 培育技术

东革阿里目前基本是野生状态,人工栽培较少,要解决资源匮乏问题需借助生物技术的力量。利用生物技术生产植物次生代谢产物主要有2种方式,即植物细胞培养和植物器官培养。

### 5.1 细胞悬浮培养

20世纪60年代发展起来的悬浮技术进行细胞培养能够获得大量的生物细胞以及次生代谢产物。它不受地区、季节、土壤及有害生物的影响,能够快速不间断的进行有效成分的大规模生产,还可通过改变培养条件和选择优良培养体系得到超过整株植物产量的代谢产物。这一技术在很多药用植物中已取得很大的成功,例如培养人参(*Panax ginseng*)细胞生产保健药物人参皂甙、紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)植物生产疗伤药物紫草宁、黄连(*Coptis chinensis*)细胞生产抗菌药物小檗碱、长春花(*Catharanthus roseus*)细胞生产阿吗碱、紫松果菊(*Echinacea purpurea*)细胞生产免疫活性多糖、红豆杉(*Taxus chinensis*)细胞生产抗肿瘤药物紫杉醇等<sup>[46]</sup>。国外也有学者对东革阿里的细胞悬浮培养进展进行了报道。

Luthfi 等<sup>[47]</sup>采用完全随机区组化设计对 MS 培养基中的6种大量元素、3种微量元素及蔗糖进行了单因素考察,观察不同浓度的基本成分对东革阿里细胞生物量和生物碱产量的影响,最后在 MS 基本培养基的基础上得到5种改良培养基;其中 MSBs 培养基既能得到最大生物产量,又能促进9-hydroxycanthin-6-one 合成;MSC 培养基适宜于2种生物碱的累积;MSD 培养基中,东革阿里细胞生物产量低,但会大量合成9-hydroxycanthin-6-one。随后 Luthfi 等<sup>[48]</sup>继续研究了酪蛋白水解物的添加和光照对东革阿里细胞生长及次生代谢产物的生产的影响,发现0.1%~2.0% (w/v) 的酪蛋白水解物对细胞生物量没有影响,但浓度为0.1%时生物碱的总含量是原来的2倍,添加5%的酪蛋白水解物能显著增加细胞生物量和生物碱的产量;光强度为0~1 525 lx 对细胞生物量都没有影响,但在1 525 lx 处细胞中的9-methoxycanthin-6-one 产量显著增加。Chan 等<sup>[49]</sup>研究了不同浓度的壳聚糖、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)对东革阿里细胞悬浮培养中细胞的生物量和生物碱的产量的诱导作用,发现100 mg/L 的壳聚糖能显著增加细胞生物量,150 mg/L 的高浓度壳聚糖对9-hydroxycanthin-6-one 的诱导作用更明显;添加2 mg/L 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  能有效刺激细胞生长,浓度为20 mg/L 时有利于生物碱的积累; $\text{Na}_2\text{CO}_3$  及 PVP 的加入对次生代谢产物的积累没有显著影响且会一定程度抑制细胞的生长,不适用于东革阿里细胞悬浮培养。Francis 等<sup>[50]</sup>则从植物生理学角度研究了不同碳源和氮源对东革阿里细胞的生物量、水解蛋白的总含量及过氧化酶的活性的影响,在浓度同为3% (w/v) 的情况下,葡萄糖比蔗糖和果糖更适合东革阿里细胞生长,能显著增加细胞鲜质量( $0.4386 \pm 0.0120$ ) g/mL,每克鲜质量中总蛋白的含量达( $0.71 \pm 3.05$ ) mg,细胞过氧化酶活性提高( $5410.04 \pm 1221.43$ ) U/mg,且碳源的利用率最高,可达( $2.81 \pm 0.31$ )  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ;氮源则考察了  $\text{KNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  及两者合用的效果,结果表明,6.0662 g/L 的  $\text{KNO}_3$  最适宜东革阿里细胞生长,显著增加细胞鲜质量( $0.2601 \pm 0.0387$ ) g/mL,每克鲜质量中总蛋白的含量达( $0.62 \pm 0.00$ ) mg/g,细胞过氧化酶活性提高( $3691.57 \pm 2717.18$ ) U/mg,且碳源的利用率最高,可达( $2.92 \pm 0.02$ )  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。细胞悬浮培养技术可用于东革阿里规模化生产次生代谢产物。

### 5.2 毛状根培养

由发根农杆菌诱导植物产生的毛状根能够在无激素的培养基上迅速生长,且能合成植物特有的次生代谢产物,因此毛状根培养技术成为生产次生代谢产物一条可靠的途径。同时由于毛状根是分化程度很高的器官培养物,代谢通路能够比较完整地表达,尤其是一些特殊的次生代谢产物的高效合成较为稳定,为大量生产提供了有用的手段。目前已经在长春花<sup>[51]</sup>、地不容(*Stephania delavayi*)<sup>[52]</sup>、川黄柏(*Phellodendron chinense*)<sup>[53]</sup>、金铁锁(*Psammosilene tunicoides*)<sup>[54]</sup>等植物上获得了成功。应用发根农杆菌侵染东革阿里诱导产生毛状根目前已有报道。Danial 等<sup>[55]</sup>应用光学显微镜观察了不同生长阶段的东革阿里种子,对东革阿里种子的形态学和组织学进行了系统的分析,发现子叶由于与菌液的接触面积较大、对农杆菌敏感、细胞分裂和 DNA 合成周期短有利于质粒的转化从而可能成功诱导毛状根。随后 Danial 等<sup>[56]</sup>尝试了5种野生发根农杆菌株系对东革阿里叶、叶柄、叶轴、根、生长3周的幼苗、体细胞胚、胚芽进行浸染,其中,经菌株

MAFF210265、MAFF301726 及 MAFF720002 浸染的成功从下胚轴处诱导出毛状根,形态为细小易断、毛状、无向地性;经 PCR 鉴定,能够检测到 rolC 和 rolD 基因,表明农杆菌的 T-DNA 已经整合进入东革阿里的细胞中。这是研究者首次应用发根农杆菌诱导出东革阿里产生毛状根的报道,为东革阿里应用毛状根技术进行植物次生代谢产物的大规模生产提供了科学依据。

## 6 展望

随着科研工作者对东革阿里药理作用研究的进一步深入,新的药理作用不断被发现,东革阿里越来越受到研究者的重视,带动了东革阿里的市场需求。目前,国内外对东革阿里的研究主要集中在化学成分及药理性质方面,对其毒理安全性研究较少。利用生物技术进行人工繁殖也取得一些成果,但仍处于起步阶段。在生态环境破坏加剧,野生资源无节制的采集,引种栽培困难,人工栽培又无法达到质量标准,市场需求进一步增大的背景下,利用植物细胞组织培养技术大规模生产药用植物有效成分乃制药行业大势所趋。植物组织细胞培养技术发展迅速,不仅在药品生产行业取得成功,在化妆品、食品等方面也取得了一定的成绩。因此,未来的研究重点在于:第一,可以从东革阿里多个化学成分中分离出有效的单体进行药理毒理研究,阐明其作用机制,使得东革阿里的应用更加安全有效;第二,研究重点应集中于如何在体外实现东革阿里有效成分的大规模培养。东革阿里的药用成分主要积累在根部,这为利用毛状根扩大生产东革阿里有效成分提供了可能。毛状根具有有效成分含量高、生理生化和遗传性稳定、易于操作控制等特点,可在离体培养条件下表现出次生代谢产物的合成能力,还能够合成许多悬浮细胞培养所不能合成的物质,某些产物的产量甚至高于常规植株及悬浮细胞培养<sup>[57]</sup>。可见,毛状根培养系统无论在生物量的增加,药用有效成分的积累,还是生产稳定性方面,都显示了其独特的优越性,使得利用毛状根培养生产东革阿里次生代谢产物具有极大的发展潜力。另外,还可利用汽雾栽培开展东革阿里根部定向培育技术研究,通过组织培养建立东革阿里的微繁殖体系,开展野外试验种植研究,为东革阿里的大规模化生产提供科学依据,以缓解野生资源紧缺无法满足市场需求的压力。

## 参考文献

- [1] Rajeev B, Karim A A. Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack): A review on its ethnobotany and pharmacological importance [J]. *Fitoterapia*,2010,81:669-679.
- [2] Kamarudin M S, Latiff A. Tumbuhan Ubatan Malaysia, Universiti Kebangsaan Malaysia and Ministry of Science [M]. Malaysia: Technology and Environment,2002:625.
- [3] Aziz R A. Phytochemical processing: the next emerging field in chemical engineering aspects and opportunities [J]. *Kejuruteraan Kimia Malaysia*,2003,3:45-60.
- [4] Aida C, Baja L, Armando M P. *Eurycoma longifolia* Jack subsp. *eglandulosa* (Merr.) Noot. (Simaroubaceae): A new distribution record from Palawan Island, Philippines [J]. *Asia Life Sciences*,2009,18(2):231-240.
- [5] Asiah O, Barbara J. Genetic Diversity of *Eurycoma longifolia* Inferred from Single Nucleotide Polymorphisms [J]. *Plant Physiology*,2003,131:1294-1301.
- [6] Jiwajinda S, Santisopasri V, Murakami A, et al. Quassinoids from *Eurycoma longifolia* as plant growth inhibitors [J]. *Phytochemistry*,2001,58:959-962.
- [7] Tada H, Yasuda F, Otani K, et al. New antiulcer quassinoids from *Eurycoma longifolia* [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*,1991,26:345-349.
- [8] Hou W B, Xuefeng X, Wei G, et al. Advances in Studies on Chemistry, Pharmacological Effect and Pharmacokinetics of *Eurycoma longifolia* [J]. *Chinese Herbal Medicines*,2011,3(3):186-195.
- [9] Chan K L, Lee S, Sam T W, et al. A quassinoid glycoside from the roots of *Eurycoma longifolia* [J]. *Phytochemistry*,1989,28:2857-2859.
- [10] Kuo P C, Shi L S, Damu A G, et al. Cytotoxic and antimalarial  $\beta$ -carboline alkaloids from the roots of *Eurycoma longifolia* [J]. *Journal of Natural Products*,2003,66(10):1324-1327.
- [11] Mitsunaga K, Koike K, Tanaka T, et al. Canthin-6-one alkaloids from *Eurycoma longifolia* [J]. *Phytochem*,1994,35:799-802.
- [12] Shafiqul Islam A K M, Ismail Z, Saad B, et al. Correlation studies between electronic nose response and headspace volatiles of

- Eurycoma longifolia* extracts[J]. Sensors and Actuators B,2006,120:245-251.
- [13] 韩凌飞,耿剑亮,孟大利,等. 东革阿里化学成分分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28(7):517-519.
- [14] Morita H, Kishi E, Takeya K, et al. New quassinoids from the roots of *Eurycoma longifolia*[J]. Chemistry Letters,1990(5):749-752.
- [15] Kardono L B S, Angerhofer C K, Tsauri S, et al. Cytotoxic and antimalarial constituents of the roots of *Eurycoma longifolia* [J]. Journal of Natural Products,1991,54(5):1360-1367.
- [16] Morita H, Kistfi E, Takeya K, et al. Highly oxygenated quassinoids from *Eurycoma longifolia* [J]. Phytochemistry,1993,33(3):691-696.
- [17] Kuo P C, Shi L S, Damu A G, et al. Cytotoxic and antimalarial  $\beta$ -carboline alkaloids from the roots of *Eurycoma longifolia* [J]. Journal of Natural Products,2003,66(10):1324-1327.
- [18] Kuo P C, Damu A G, Lee K H, et al. Cytotoxic and antimalarial constituents from the roots of *Eurycoma longifolia*[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry,2004,12:537-544.
- [19] Tee T T, Cheah Y H, Hawariah L P. A fraction from *Eurycoma longifolia* Jack extract, induces apoptosis via a caspase-9-independent manner in MCF-7 cells[J]. Anticancer Research,2007,27:3425-3430.
- [20] Zakaria Y, Rahmat A, Pihie A H, et al. Eurycomanone induce apoptosis in HepG2 cells via up-regulation of p53[J]. Cancer Cell International,2009,9(16):710-719.
- [21] Pooi-Fong Wonga, Wei-Fun Cheongb, Meng-Hooi Shub, et al. Eurycomanone suppresses expression of lung cancer cell tumor markers, prohibitin, annexin I and endoplasmic reticulum protein[J]. Phytomedicine,2012,19:138-144.
- [22] Chan K L, O'Neil M J, Phillipson J D, et al. Plants as sources of antimalarial drugs. Part31 *Eurycoma longifolia*[J]. Planta Medica,1986,52(2):105-107.
- [23] Kuo P C, Damu A G, Lee K H, et al. Cytotoxic and antimalarial constituents from the roots of *Eurycoma longifolia* [J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry,2004,12(2):537-544.
- [24] Kirby G C, O'Neill M J, Phillipson J D, et al. In vitro studies on the mode of action of quassinoids with activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*[J]. Biochemical Pharmacology,1989,38(24):4367-4374.
- [25] Ang H H, Sim M K. *Eurycoma longifolia* Jack enhances libido in sexually experienced male rats[J]. Journal of Experimental Animal Science,1997,46(4):287-290.
- [26] Ang H H, Cheang H S, Yusof A P M d. Effects Of *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali) on the initiadon of sexual performance of inexperienced castrated male rats[J]. Journal of Experimental Animal Science,2000,49(1):35-38.
- [27] Lin L C, Peng C Y, Wang H S, et al. Reinvestigation of the chemical constituents of *Eurycoma longifolia*[J]. Chinese Pharmaceutical Journal,2001,53(2):97-106.
- [28] Wahab N A, Mokhtar N M, Halim W N, et al. The effect of *Eurycoma longifolia* Jack on spermatogenesis in estrogen-treated rats[J]. Clinics,2010,65(1):93-98.
- [29] Solomon M C, Erasmus N, Henkel R R, et al. In vivo effects of *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali) extract on reproductive functions in the rat[J]. Andrologia,2013,7(7):26-32.
- [30] 杜闻伟,高善荣,罗崇念,等. 植物 Tongkat Ali 提取物壮阳作用的实验研究[J]. 现代中药研究与实践,2008,22(6):44-47.
- [31] 乔同岭. 玛咖和东哥阿里对游泳训练大鼠血清睾酮水平的影响[D]. 苏州:苏州大学,2012.
- [32] Low B S, Das P K, Chan K L. et al. Standardized quassinoid-rich *Eurycoma longifolia* extract improved spermatogenesis and fertility in male rats via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis[J]. Journal of Ethnopharmacol,2013,145(3):706-714.
- [33] Low B S, Choi S B, Abdul Wahab H, et al. Eurycomanone, the major quassinoid in *Eurycoma longifolia* root extract increases spermatogenesis by inhibiting the activity of phosphodiesterase and aromatase in steroidogenesis[J]. Journal of Ethnopharmacol,2013,149(1):201-207.
- [34] Polonsky J, Bhatnagar S C, Griffiths D C, et al. Activity of quassinoids as antifeedants against aphids[J]. Chemistry and Ecology,1989,15(3):993-998.
- [35] Husen R, Pihie A H, Nallappan M, et al. Screening for antihyperglycaemic activity in several local herbs of Malaysia[J]. Ethnopharmacol,2004,2(95):205-208.
- [36] Farouk A E, Benafri A. Antibacterial activity of *Eurycoma longifolia* Jack, A Malaysian medicinal plant[J]. Saudi Medical Journal,2007,28:1422-1424.
- [37] Shuid A N, Abu Bakar M F, Abdul Shukur T A, et al. The anti-osteoporotic effect of *Eurycoma longifolia* in aged orchidectomised rat model[J]. Aging Male,2010,14(3):150-154.
- [38] 史珣,贺伟,胥红梅,等. 几种天然产物对痛风性关节炎的影响初探[J]. 天然产物研究与开发,2012(24):1362-1366.
- [39] Al-Salahi O S, Kit-Lam C, Majid A M, et al. Anti-angiogenic quassinoid-rich fraction from *Eurycoma longifolia* modulates en-

- dothelial cell function[J]. *Microvascular Research*,2013,90:30-39.
- [40] Talbott S M, Talbott J A, George A, et al. Effect of Tongkat Ali on stress hormones and psychological mood state in moderately stressed subjects[J]. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*,2013,10(1):28-29.
- [41] Singaram N, Teo C K H. Factors affecting the biomass production of Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia*) [J]. *Malaysian Applied Biology*,1994,22(2):197-203.
- [42] Sobri H, Rusli I, Anna L P K, et al. Micropropagation of *Eurycoma longifolia* Jack via Formation of Somatic Embryogenesis [J]. *Asian Journal of Plant Sciences*,2005,4(5):472-485.
- [43] Hussein S, Rusli I, Anna L P K, et al. Multiple shoots formation of an important tropical medicinal plant, *Eurycoma longifolia* Jack[J]. *Plant Biotechnol*,2005,22:349-351.
- [44] Maziah M, Rosli N, Sreeramanan S. Optimization of suitable auxin application in a recalcitrant woody forest plant of *Eurycoma longifolia* (Tongkat Ali) for callus induction[J]. *African Journal of Biotechnology*,2010,9(49):8417-8428.
- [45] Hassan N, Ruslan A, Ling S K, et al. Micropropagation and production of eurycomanone, 9-methoxycanthin-6-one and canthin-6-one in roots of *Eurycoma longifolia* plantlets[J]. *African Journal of Biotechnology*,2012:6818-6825.
- [46] 项雷文,郑建兵. 植物细胞培养技术生产天然产物[J]. *食品研究与开发*,2002,6(23):4-6.
- [47] Luthfi A M S, Chan L K, Boey P L. Effects of Medium Constituents on Growth and Canthinone Accumulation in Cell Suspension Cultures of *Eurycoma longifolia* Jack[J]. *Hayati Journal of Biosciences*,2009,3:1014-1018.
- [48] Luthfi A M S, Boey P L, Chan L K. Effects of Casein Hydrolysis and Light Intensity on Production of Biomass and Canthinone Alkaloid in Cell Suspension Cultures of Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) [J]. *Makara of Science Series*,2010,12:879-885.
- [49] Chan K L, Ang S W, Arvind B. Elicitation effect on cell biomass and production of alkaloids in cell suspension culture of the tropical tree *Eurycoma longifolia*[J]. *Research Journal of the Costa Rican Distance Education University*,2010,2(2):239-244.
- [50] Francis C P, Anna P K, Siew L H. Towards understanding of physiological changes in cell culture of recalcitrant woody plant, *Eurycoma longifolia*, in response to carbon and nitrogen sources[J]. *Journal of Medicinal Plants Research*,2011,5(14):3200-3209.
- [51] 孙敏,汪洪,王颖,等. 长春花转化毛状根诱导及培养条件的优化[J]. *西南师范大学报:自然科学版*,2002,27(4):549-552.
- [52] 罗寿青,胡虹,杨崇仁,等. 地不容毛状根的培养[J]. *云南植物研究*,1997,19(4):411-414.
- [53] 王跃华,苟小军,吴洁,等. 川黄柏毛状根的诱导及活性成分的产生[J]. *中国中药杂志*,2006,31(22):1853-1856.
- [54] 高帅,王洪峰,侯丽丽,等. 不同培养条件对金铁锁毛状根生长的影响[J]. *广东林业科技*,2012,12(2):16-20.
- [55] Danial M, Keng C L, Alwee S S R S, et al. Seed histology of recalcitrant *Eurycoma longifolia* plants during germination and its beneficial attribute for hairy roots production[J]. *Journal of Medicinal Plants Research*,2005,5(1):93-98.
- [56] Danial M, Keng C L, Alwee S S R S, et al. Chemotaxis movement assay of *Eurycoma longifolia* using wild and disarmed strains of *Agrobacterium rhizogenes*[J]. *Journal of Medicinal Plants Research*,2011,5(8):1405-1410.
- [57] 孙敏. 药用植物毛状根培养与应用[M]. 重庆:西南师范大学出版社,2010.