

瑞香狼毒不定芽生长过程黄酮类和香豆素类成分累积研究

黄嘉琦, 赵 越, 孙凤阳, 胡 颖, 由香玲*

东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: 目的 研究瑞香狼毒 *Stellera chamaejasme* 不定芽生长过程黄酮类和香豆素类成分的累积规律。方法 采用组织培养筛选不定芽诱导和生长的最适培养基; 分别通过分光光度法、高效液相色谱法分析不定芽生长过程总黄酮和 3 种香豆素类成分伞形花内酯、瑞香素和东莨菪内酯的动态累积。结果 不定芽诱导最适培养基为 MS+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA, 培养 4 周后, 平均每个顶芽诱导 35 个不定芽; 不定芽生长最适培养基为 MS+0.3 mg/L BA+0.1 mg/L NAA, 培养 4 周后, 芽平均株高为 2.3 cm; 生长在最适培养基的不定芽, 其总黄酮的累积量在第 5 周达到最高, 为 0.218 g; 3 种香豆素类成分的量在整个不定芽生长中均表现随培养时间而增加, 到第 5 周, 质量分数均达到最高值, 但均不及野生根中的量, 而且质量分数高低顺序也发生变化。结论 瑞香狼毒不定芽中黄酮类和香豆素类成分累积最高为培养后的第 5 周。

关键词: 瑞香狼毒; 不定芽; 黄酮类; 香豆素; 累积

中图分类号: R282.4 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)10-1328-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.024

Accumulation of flavonoids and coumarins during adventitious bud growth in *Stellera chamaejasme*

HUANG Jia-qi, ZHAO Yue, SUN Feng-yang, HU Ying, YOU Xiang-ling

College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the accumulation of flavonoids and coumarins during the growth of adventitious buds in *Stellera chamaejasme*. **Methods** The optimal culture media for the induction and the growth of adventitious buds were screened through tissue culturing. The dynamic accumulation of the total flavonoids and three components of coumarin (umbelliferone, daphnetin, and scopoletin) was analyzed by visible spectrophotometry and high-performance liquid chromatography methods, respectively. **Results** The optimal condition for the induction of adventitious bud proliferation was MS + 0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA; After 4-week culture, the number of adventitious buds in every tip-bud was 35; The optimal condition for the growth of adventitious bud was MS + 0.3 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA; After 4-week culture, the average length of buds was 2.3 cm; The amount of total flavonoids increased to the highest of 0.218 g after 5-week culture of the adventitious buds; The amount of the three components of coumarin increased with culturing time increasing during the growth of adventitious buds, and increase to the highest at week 5. But the contents of the components were lower than those in the wild roots, and the descending order had changed. **Conclusion** The accumulation of flavonoids and coumarins in adventitious buds of *S. chamaejasme* could reach to the highest at week 5 of culture.

Key words: *Stellera chamaejasme* L.; adventitious buds; flavonoids; coumarins; accumulation

瑞香狼毒 *Stellera chamaejasme* L. 为瑞香科狼毒属多年生草本植物, 民间称为红狼毒、断肠草等。主要分布于河北、内蒙古、黑龙江等地^[1]。狼毒作为中药始载于《神农本草经》, 其后《中药大辞典》中其功效也有记载, 主治疗水肿腹胀, 痰、食、心腹疼痛, 慢性气管炎, 咳嗽气喘, 淋巴结、皮肤、骨等结核^[2-3]。

现代医学研究发现其主要化学成分有黄酮类、香豆素类、萜类、木脂素类和苯丙烯酸醇苷类等。其中黄酮类成分有抗菌、抗病毒的作用; 瑞香烷型二萜具有抗肿瘤作用^[4-8]。香豆素类化合物是瑞香科植物的特征性成分, 且大多具有较强生物活性^[7,9]。

目前, 相关瑞香狼毒的研究主要集中在毒理和

收稿日期: 2012-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (J1210053)

作者简介: 黄嘉琦 (1985—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为药用植物细胞工程。Tel: (0451)82191752 E-mail: ahuangjiaqi@126.com

*通信作者 由香玲 Tel: (0451)82191752 E-mail: yxiangling@yahoo.com

网络出版时间: 2013-03-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130328.1119.007.html>

药理及化学成分鉴定方面^[10-14]。关于无性繁殖及其药用成分合成的机制研究还很少。实际上,因瑞香狼毒具剧毒能使大量人畜死亡,而被视为毒草成为草地重点防除的对象;而随着我国大面积退化草地的恢复与重建,瑞香狼毒作为一种宝贵的中药资源将变得短缺^[15]。通过人工技术对其进行无性繁殖,不管对解决上述资源问题,还是对其药用活性物质的调控及其机制的研究都具有重要意义。有关于其无性繁殖方面的文献报道仅见于福科等^[15]的研究,以茎尖为外植体建立了瑞香狼毒的再生体系。本实验主要研究了瑞香狼毒不定芽的无性快繁及其过程中有效物质(黄酮类和香豆素类物质)的累积规律,为其优良品种的进一步无性扩大栽培,及其药用活性物质合成调控等方面的研究奠定基础。

1 材料

实验中所用的瑞香狼毒采自大庆市杜尔伯特蒙贝子草原,经东北林业大学园林学院王菲副教授鉴定为瑞香狼毒 *Stellera chamaejasme* L. 的种子。

2 方法

2.1 瑞香狼毒芽无性繁殖体系的建立

将采集的瑞香狼毒种子反复清洗、流水冲洗 24 h 后进行消毒处理:先后用 75%的乙醇、17%次氯酸钠溶液分别浸泡 10 s、10 min,无菌水冲洗 4~5 次后接种于装有木本植物培养基(w Woody plant medium, WPM)、MS、1/2 MS 无激素培养基的 50 mL 三角瓶中,每瓶接 14 粒种子,每个处理各接 10 瓶。置于培养室的箱子避光培养,使种子萌发。

2.2 瑞香狼毒不定芽的诱导及其增殖

2.2.1 不定芽的诱导 选取 MS 固体培养基光下培养 15 d 高 1 cm 左右、生长状态良好的瑞香狼毒幼苗用作芽繁殖的材料。将顶芽切下接入添加有 20 g/L 蔗糖、及 BA (0~1.0 mg/L) 和 NAA (0~0.5 mg/L) 的 MS 培养基中诱导不定芽。装有 30 mL 培养基的 100 mL 三角玻璃瓶中,每瓶接 4 个芽、每个处理接 15 瓶,于培养室中光培养。

2.2.2 培养基对不定芽增殖的影响 选取同一种培养条件下培养、状态一致的不定芽(1.5 cm)种作为接种材料。根据“2.2.1”项中实验结果,确定的最佳植物生长调节剂组合,添加于 WPM、MS、1/2 MS (20 g/L 蔗糖) 3 种固体培养基作为培养条件。考察培养基种类对不定芽增殖的影响。装有 30 mL 培养基的 100 mL 三角瓶中,每个处理接 15 瓶,于培养室中光培养。

2.2.3 繁殖芽的快速生长 为了使诱导的不定芽进一步生长,将其接种于“2.2.2”项确定的含 20 g/L 蔗糖 MS 培养基中,使其快速生长。每瓶接 4 个芽,于培养室中培养。

2.2.4 培养条件及数据分析方法 本实验中所用的培养基都是首先调节 pH 为 5.8~6.0,经过高温、高压灭菌锅灭菌(121 °C、1~1.5 Pa, 15 min)后使用。组织培养室的温度为(23±2) °C,光照周期为 16/8 h (光照/黑暗),光照强度为 20~30 μmol·lx/(m²·s)。

本实验数据分析主要采用 Excel、SPSS 统计分析软件完成。

2.3 瑞香狼毒芽快繁过程中药用物质的累积

将不定芽接种于“2.2.2”项中确定的不定芽的最佳生长条件下进行培养,每隔 7 d 取材,称量鲜质量,置于干燥箱 120 °C 杀青后,60 °C 烘干 48 h,称定干质量后用研钵研碎收藏,用于分析芽生长过程中生物量及其药用物质——香豆素类及黄酮类物质的累积规律。

2.4 总黄酮量积累分析

2.4.1 标准曲线的绘制 主要参考郑宝江^[16]的总黄酮的测定方法。本实验所用的芦丁对照品购自中国药品生物制品检定所,批号 100080-200707。首先将对照品溶液于波长 400~600 nm 测定 A 值,确定最大吸收波长为 550 nm。然后在该波长下,以吸光度(A)值为纵坐标,质量分数为横坐标绘制标准曲线。

2.4.2 总量黄酮的检测 采用超声波法对其总黄酮进行提取。将不定芽接种于“2.2.2”项中确定的培养条件进行培养,每隔 7 d 取材,称量鲜质量后置于 120 °C 杀青后置 60 °C 烘干 48 h 用研钵研碎,精密称定 0.2 g 干样粉末放入 10 mL 离心管中,加入 50%的乙醇溶液 5 mL,密封好后置于超声波反应器中提取 90 min。精密吸取供试品溶液 2 mL,按标准曲线制备项下的方法测定 A 值,从标准曲线上读出供试品中总黄酮的量,计算得样品中总黄酮量。

2.5 3 种香豆素类物质累积分析

2.5.1 供试品溶液的制备 称取 2.0 g 瑞香狼毒干样品,加入 10 mL 95%乙醇,80 °C 加热回流 1 h,重复 3 次。每次取上清液滤过、浓缩,用分析纯甲醇定容至 2 mL,摇匀,经过 0.45 μm 微孔滤膜滤过,滤液作为样品溶液备用。

2.5.2 色谱条件 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温 35 °C,流动相 A 为乙腈, B 为冰乙酸溶

液,梯度洗脱,0~10 min, 9%A; 10~20 min, 12%A; 20~30 min, 13%A; 30 min, 21%A。体积流量 1.0 mL/min, 进样量 20 μ L, 检测波长 327 nm, 采用外标法定量测定。色谱图见图 1。

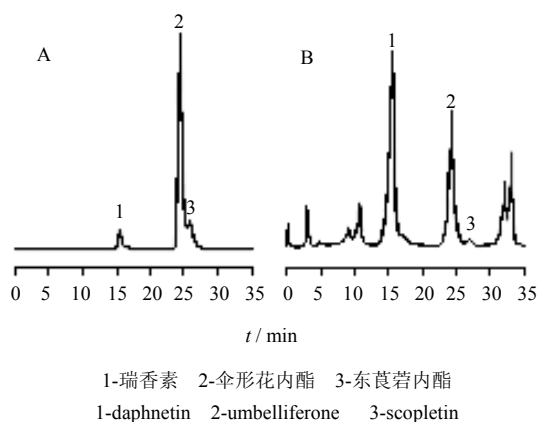


图 1 对照品 (A) 和样品中 3 种香豆素类物质 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of three coumarin components in reference substances (A) and adventitious buds (B)

2.5.3 标准曲线的绘制 精密称取 3 种香豆素伞形花内酯、瑞香素、东莨菪内酯对照品 (质量分数均大于 98%) 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg, 置 2 mL 量瓶中用甲醇溶解并稀释至刻度制成对照品溶液。在色谱条件下建立吸收峰面积和 3 种香豆素伞形花内酯、瑞香素、东莨菪内酯量的回归方程 (表 1)。

表 1 3 种香豆素类物质的回归方程

Table 1 Standard curves of three components of coumarin

香豆素类物质	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / (mg·L ⁻¹)
瑞香素	$Y=7 \times 10^7 - 15\,086$	0.999 2	0~0.06
伞形花内酯	$Y=2 \times 10^8 - 93\,869$	0.999 5	0.02~0.10
东莨菪内酯	$Y=1 \times 10^8 - 32\,570$	0.999 7	0~0.06

2.5.4 精密度试验 称取同瑞香狼毒样品粉末 1 份,按“2.5.1”项下方法制备供试品溶液,在“2.5.2”项色谱柱条件下,连续测定 6 次样品中伞形花内酯、瑞香素、东莨菪内酯峰面积值。3 种物质峰面积值的 RSD 分别为 1.3%、1.4%、1.4%。

2.5.5 稳定性试验 称取瑞香狼毒不定芽干样品 2.0 g,按上述方法制备供试品溶液,在室温下保存,分别于 0、2、4、6、8 h 测定 3 种香豆素物质的峰面积值。伞形花内酯、瑞香素、东莨菪内酯峰面积的 RSD 分别为 1.38%、1.25%和 1.40%。表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.5.6 重复性试验 称取同瑞香狼毒样品粉末 5 份,

按“2.5.1”项下方法分别制得 5 份供试品溶液,分别测定伞形花内酯、瑞香素、东莨菪内酯峰面积值,计算伞形花内酯、瑞香素、东莨菪内酯的峰面积 RSD,分别为 1.76%、1.88%、1.75%,表明样品处理过程和测定方法均有良好的重复性。

2.5.7 加样回收率试验 精密称取已测定的狼毒不定芽样品 3 组,每组 5 份,分别精密加入浓度已知溶液的对照品,制备样品溶液,进行测定。计算得伞形花内酯、瑞香素、东莨菪内酯的加样回收率分别为 98.5%、98.3%、97.9%,RSD 为 0.62%、0.61%、0.61%。

3 结果与分析

3.1 瑞香狼毒芽无性繁殖体系的建立

3.1.1 无菌条件下种子萌发 瑞香狼毒种子消毒后在 MS、1/2 MS、WPM 固体培养基 (含 20 g/L 蔗糖) 中暗培养 15 d 后,统计发芽情况。结果显示,3 种培养基中种子的发芽率分别为 0、14.2%和 78.6%。由此可见,种子无菌发芽的最佳培养基为 WPM 固体培养基。

3.1.2 瑞香狼毒不定芽的诱导 无菌幼苗的顶芽接种于含有不同质量浓度 BA、NAA 的 MS 培养基 (含 20 g/L 蔗糖) 中,4 周后对不定芽的诱导情况进行统计,结果见表 2。

不同质量浓度的两种植物生长调节剂组合对不定芽的诱导作用差异显著。在 0.1 mg/L BA+0.01 mg/L NAA 条件下顶芽的诱导率 (37.5%) 最低,且外植体逐渐变枯小 (图 2-A),生成的不定芽较少 (表 2); 顶芽在 0.3 mg/L BA+0.1 mg/L NAA、0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 条件下不定芽诱导率都为 100%,但是诱导芽的数量和芽的生长却差异很大。前者不定芽的数量较少但是芽的生长却最长,平均为 2.3 cm; 后者数量最多为 35 个 (表 2,图 2-B、D)。而且顶芽在 0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 条件下培养 3 周,产生大量的愈伤组织 (图 2-C),继而从上面产生大量的不定芽 (图 2-D)。当 BA 提高到 1.0 mg/L, NAA 为 0.5 mg/L 时,顶芽大量愈伤化,仅产生少量不定芽 (图 2-E)。因此,利用顶芽进行不定芽诱导增殖的最佳条件为 0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA,而不定芽最佳伸长生长的条件为 0.3 mg/L BA+0.1 mg/L NAA。

3.1.3 培养基对不定芽增殖的影响 根据确定的诱导不定芽的最佳植物生长调节剂为 0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA。利用上述诱导的不定芽为材料,考察了 WPM、MS、1/2 MS 对不定芽增殖的影响。

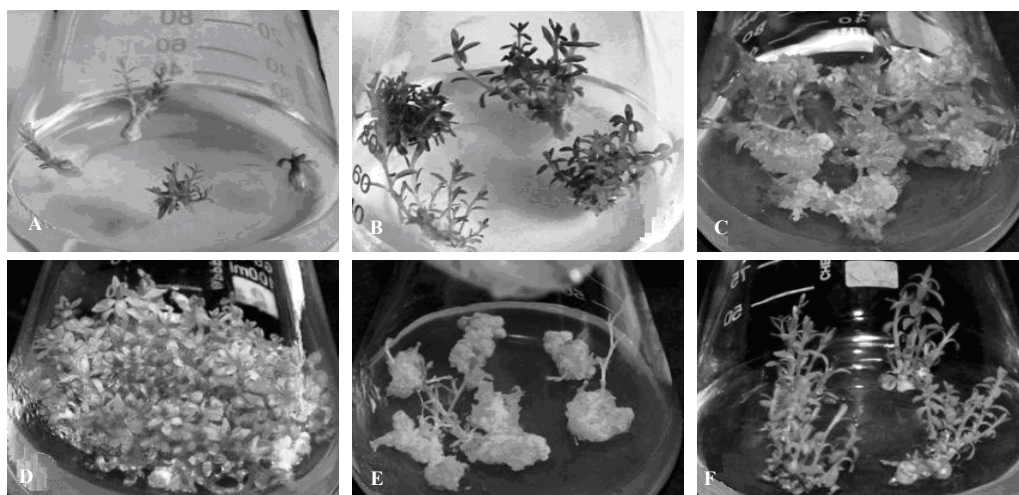
表 2 不同植物生长调节剂组合对狼毒不定芽的诱导作用

Table 2 Effects of various combinations of plant growth regulators on induction of adventitious buds in *S. chamaejasme*

BA / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)	不定芽诱导率 / %	平均不定芽数/外植体个数	平均不定芽高度 / cm
0.1	0.01	37.6±0.20 c	2.5± 0.42 d	0.5±0.10 c
0.5	0.10	100.0±0 a	5.7± 0.51 c	1.2±0.10 b
1.0	0.50	60.0±0.12 b	5.6± 0.33 c	0.6±0.05 c
0.3	0.10	100.0±0 a	7.6±33.00 b	2.3±0.11 a
0.5	0.50	100.0±0 a	35.0± 0.57 a	0.5±0.06 c

数值运用 Duncans 多重比较分析, 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 下表同

Defferent letters within each column mean significant difference ($P<0.05$) indicated by Duncan's multiple range test, same as below



A、B、E-分别为顶芽在 0.1 mg/L BA+0.01 mg/L NAA、0.3 mg/L BA+0.1 mg/L NAA、1.0 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 条件下培养 4 周诱导的不定芽; C、D-分别为顶芽培养在 0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 条件下培养 3 周和 4 周诱导的愈伤组织及不定芽; F-为不定芽在 0.3 mg/L BA+0.1 mg/L NAA 条件下培养 3 周的伸长生长

A, B, E-adventitious buds induced under 0.1 mg/L BA + 0.01 mg/L NAA, 0.3 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA, and 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA, respectively; C, D-calli and adventitious buds induced under 0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA for 3 and 4 weeks culture, respectively; F-elongation growth of adventitious buds under 0.3 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA for 3 weeks culture

图 2 无菌幼苗的顶芽在含有 BA 和 NAA 的 MS 培养基中诱导的不定芽

Fig. 2 Adventitious buds from tip-buds of sterile seedling induced in MS media with BA and NAA

培养 4 周后的结果见表 3。从表 3 中可以看出, 3 种培养基对不定芽的诱导率都为 100%, 且诱导的不定芽平均高度相差不大, 都约为 0.5~0.6 cm。但诱导的不定芽的个数相差明显, MS+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 条件下, 诱导的不定芽个数最多, 为 35 个。

3.2 瑞香狼毒不定芽生长过程中生物量的累积

将不定芽在确定的不定芽生长最佳条件 (MS+

0.3 mg/L BA+0.1 mg/L NAA) 下培养 6 周, 每周取材所得不定芽的鲜质量和干质量的结果见图 3。从图 3 中可以看出, 在培养的前 3 周不定芽的鲜质量和干质量都快速增加, 到 4 周达到最高, 以后基本变化不大。主要是由于培养基的营养成分有限, 限制了芽的进一步生物生长。因此, 本实验条件下, 不定芽的最大生物量于培养 4 周达到最大, 培养周期为 4 周。

表 3 在添加 0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 的 3 种培养基条件下培养 4 周不定芽的增殖

Table 3 Propagation of adventitious buds cultured in three kinds of media with 0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA for 4 weeks

培养基类型	不定芽诱导率 / %	不定芽数/外植体个数	不定芽平均高度 / cm
WPM	100	3.0±0.57 c	0.5±0.02
MS	100	35.0±0.57 a	0.5±0.06
1/2 MS	100	16.0±0.12 b	0.6±0.10

3.3 瑞香狼毒芽生长周期过程中药用物质累积量

3.3.1 总黄酮的积累分析 根据“2.4.1”项的方法, 绘制黄酮标准曲线方程为 $Y=0.4486X+0.0014$, $r=0.997$; 在 $0.2\sim1.0\text{ mg}$ 有良好的线性关系。根据上述标准曲线测定了不定芽在生长过程中总黄酮的量及总黄酮的累积量, 结果见图4。随着不定芽的生长, 3周时间内, 总黄酮的量是逐渐增加; 3周以后, 总黄酮量基本持平。而总黄酮的累积量则在第5周达到最大, 以后变化不大。总黄酮量和累积量没有同时达到最大, 主要是由于干物质的累积在第4周还有较大的生长。

3.3.2 香豆素类物质累积分析 根据标准曲线测定了不定芽在生长过程中3种香豆素类物质的量, 结果见表4。不定芽在整个取材的6周时间内, 3种物质的量有很大差异。其中, 东莨菪内酯量在整个生长过程中都很低, 且变化不大; 与野生根中的量相差一个数量级还多。瑞香素在培养前4周量变化都不大, 在第4周到第5周时间内持续增高, 到第5周以后基本持平; 能达到野生根量的50%左右。而伞形花内酯的量变化最显著。在接种后前3周量变化不大, 但其累积在第3周以后到第4周一周时间内急速增高, 以后基本持平; 到最后能达到野生根

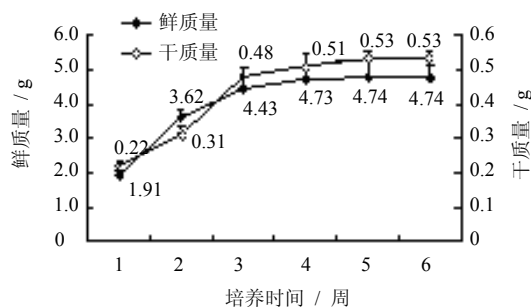


图3 不定芽培养6周的生物量

Fig. 3 Biological growth of adventitious buds cultured for 6 weeks

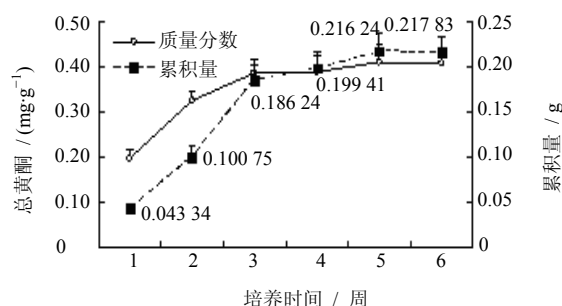


图4 生长过程中不定芽总黄酮量及累积量变化

Fig. 4 Changes of flavonoids content and accumulation during growth of adventitious buds

表4 生长过程中不定芽3种瑞香狼毒物质的质量分数

Table 4 Content changes of three coumarin components in adventitious buds during their growth

培养时间 / 周	伞形花内酯 / (mg·g ⁻¹)	瑞香素 / (mg·g ⁻¹)	东莨菪内酯 / (mg·g ⁻¹)
1	0.033 4±0.000 82 a	0.005 0±0.000 34 a	0.003 2±0.000 23 a
2	0.061 1±0.000 94 b	0.005 9±0.000 42 a	0.004 1±0.000 36 b
3	0.069 1±0.000 86 c	0.006 0±0.000 53 a	0.004 3±0.000 33 b
4	0.203 2±0.008 99 d	0.006 2±0.000 58 a	0.004 4±0.000 39 b
5	0.222 1±0.002 44 e	0.008 1±0.001 21 b	0.004 7±0.000 40 b
6	0.222 5±0.009 62 e	0.008 2±0.000 99 b	0.004 7±0.000 40 b
野生根	0.452 5±0.022 54	0.010 1±0.001 22	0.057 4±0.004 61

中该成分量的50%左右。综合不定芽在生长过程中3种香豆素类物质的累积变化规律, 确定其最佳的培养时间是5周进行收获。

4 讨论

本研究主要建立了瑞香狼毒不定芽的快繁殖体系, 以及初步探讨了不定芽在生长过程中2类有效物质——总黄酮和3种香豆素类物质的累积规律。在培养到第5周的时间里, 伞形花内酯能达到野生根中量的50%左右, 瑞香素能达到80%左右, 而东莨菪内酯的量却极低, 低于野生根中的十分之一。

胡爽^[17]也利用HPLC分析了10个不同地域瑞香狼毒根中3种物质的量, 其范围分别是伞形花内酯0.364~0.924 mg/L, 瑞香素0.008~0.033 mg/L, 东莨菪内酯0.012~0.035 mg/L。由此可见瑞香狼毒野生根中瑞香素和东莨菪内酯的量相对较低, 且两者基本处于同一个数量级, 而本研究中不定芽生长过程中的东莨菪内酯的量却极低, 但是其他两种物质瑞香素和伞形花内酯的能在短时间内快速积累。出现这种现象可能与培养过程中植物激素的使用有关。大量的研究显示, 许多植物激素影响

其次生代谢成分的合成,如茉莉酸、茉莉酸甲酯、水杨酸、乙烯等植物激素通常可以诱导次生代谢物质的合成^[18]。生长素类物质对次生代谢物质合成的影响因为植物的种类不同而不同。在人参毛状根的培养过程中,徐立新^[19]比较了 IBA、NAA 和 2,4-D 3 种物质对人参总皂苷及 Rb₁ 的影响,发现 NAA 要优于其他两种植物生长调节剂。而在东北红豆杉细胞培养中使用了 NAA 和 BA 不同浓度组合,结果发现,仅有 6-BA 作用的细胞内紫杉醇大量积累^[20]。上述研究对机制的揭示主要集中在信号传导方面。本研究中培养材料与栽培株相比,植物激素是否、如何影响香豆素类物质的合成仍需进一步研究。本研究为瑞香狼毒无性大量扩繁、生产有效物质,及其有效物质累积调控机制的揭示奠定了重要基础。

参考文献

- [1] 陈翼胜,郑 硕. 中国有毒植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [2] 张美妮,刘玉玺. 瑞香狼毒研究进展 [J]. 山西医药杂志, 2000, 29(3): 213-215.
- [3] 贾正平,樊俊杰. 瑞香狼毒水提物小鼠药物血清对小鼠白血病 L1210 细胞增殖、克隆形成和 DNA 合成的影响 [J]. 中草药, 2001, 32(9): 807-809.
- [4] 栗晓黎,林瑞超,王兆基,等. 毒性中药狼毒质量标准研究 [J]. 中成药, 2006, 28(4): 498-503.
- [5] 李 杰,张 静. 中药狼毒抗癌作用研究进展 [J]. 中药研究, 1996(5): 44-46.
- [6] 刘 欣,叶文才,车镇涛,等. 瑞香狼毒的化学成分研究 [J]. 中草药, 2004, 35(4): 379-381.
- [7] 汤亚杰,徐小玲,李冬生,等. 瑞香狼毒化学成分与抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中成药杂志, 2008, 30(7): 21-23.
- [8] 刘文程,王 臣. 瑞香狼毒的化学成分、生物活性及应用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(1): 26-30.
- [9] 张文亮,李荣亨. 瑞香素药理作用研究现状 [J]. 实用中医药杂志, 2007, 23(6): 402-403.
- [10] 吴漫晔. 瑞香狼毒药材化学成分研究 [M]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
- [11] Yoshida M, Feng W, Saijo N, *et al.* Antitumor activity of daphnane-type diterpene gnidimacrin isolated from *Stellera chamaejasme* L. [J]. *Int J Cancer*, 1996, 66(2): 268-273.
- [12] Yoshida M, Yokokura H, Hidaka H, *et al.* Mechanism of antitumor action of PKC activator, gnidimacrin [J]. *Int J Cancer*, 1998, 77(2): 243-250.
- [13] 曹 挥,刘素琪,赵莉藿,等. 瑞香狼毒提取物对山楂叶螨的生物活性及酶活性影响 [J]. 林业科学, 2003, 29(1): 98-102.
- [14] 侯太平,崔 球,向瑞礼,等. 从瑞香狼毒中提取灭蚜活性物质的研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2001, 38(5): 744-747.
- [15] 于福科,马永清,李秀维. 瑞香狼毒的组织培养及快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(1): 59-60.
- [16] 郑宝江. 环境梯度变化对松嫩草地有毒植物影响的研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2006.
- [17] 胡 爽. 瑞香狼毒药材质量标准及炮制品药学研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2011.
- [18] 王春丽,梁宗锁. 外源刺激对植物次生代谢的调节及其信号转导途径研究进展 [J]. 西北植物学报, 2009, 5: 1055-1065.
- [19] 徐立新. 植物激素和诱导子对人参发根皂苷含量的影响研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- [20] 肖文海. 东北红豆杉细胞培养过程中细胞分化与次生代谢间关系的系统分析 [D]. 天津: 天津大学, 2010.