

药用植物干细胞培养技术及其应用

徐春明, 王英英, 庞高阳, 李 丹

北京工商大学食品学院 食品添加剂与配料北京高校工程研究中心 北京市食品风味化学重点实验室, 北京 100048

摘 要: 着重介绍了药用植物干细胞培养技术的建立方法及其在长期培养、悬浮培养、扩大培养及低温储藏方面较传统植物细胞培养技术的优势, 同时综述了药用植物干细胞培养技术在生产天然产物, 开发药品、功能性食品和化妆品, 建立主细胞库及基础研究等方面的应用, 并对其未来的发展方向进行了展望。

关键词: 药用植物; 干细胞培养; 悬浮培养; 天然产物; 低温储藏

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)20-2940-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.20.026

Stem cell culture technique of medicinal plants and its application

XU Chun-ming, WANG Ying-ying, PANG Gao-yang, LI Dan

Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China

Key words: medicinal plants; stem cell culture; suspension culture; natural products; cryopreservation

植物是许多重要药用化学物质的来源。许多植物含有抗病毒、抗菌、抗癌和抗氧化等生理活性的化合物, 对人类的肿瘤、衰老、心血管等多种疾病的防治具有重要意义。植物是探究新药的理想来源, 因此越来越多的研究者关注植物次生代谢产物的生产。

获取药用植物次生代谢产物的方法有许多种, 目前多数是从药用植物中直接提取。但是很多药用植物生长缓慢, 次生代谢产物的量低而且许多仅存于特定的植物器官中, 难以适应现代制药工业生产的需求^[1]; 采用化学合成也难以实现原料供应, 因为很多次生代谢产物化学结构非常复杂和独特, 涉及的生物合成途径繁杂, 合成成本高。因此, 尤其是对于一些珍稀濒危的中药来说, 植物细胞培养依旧是获取次生代谢产物相对可行的选择。目前通过植物细胞培养成功的例子已经有很多, 如从红豆杉中培养获得紫杉醇, 从紫草中培养获得紫草素, 从人参中培养获得人参皂苷等^[2-4]。尽管如此, 植物细胞培养在工业生产中还存在很多局限性^[5-6], 如传统植物细胞培养需经历一个脱分化过程, 但脱分化细胞的次生代谢产物丰度非常低, 甚至根本没有^[7-9],

而且在这个过程中会发生体细胞突变, 导致细胞系遗传稳定性降低; 另外在长期培养过程中, 细胞会受到环境的影响, 增长慢、收益率低, 阻碍其商业化生产^[10-15]。Lee 等^[16]利用植物干细胞培养技术提供了一个不同于传统细胞培养的新方案, 解决了传统细胞培养存在的易变异、细胞聚集等瓶颈问题。本文主要对药用植物干细胞培养技术的建立方法及其与传统植物细胞培养技术相比较的优势进行综述, 并对其未来的发展方向进行了展望。

1 植物干细胞

植物干细胞又称为分生组织, 是相对于植物体内已经分化的成熟组织而言的, 是植物体内未分化的细胞。植物分生组织根据其位置可以分为顶端分生组织和侧生分生组织两大类。其中顶端分生组织包括茎尖分生组织 (shoot apical meristem, SAM) 和根尖分生组织 (root apical meristem, RAM); 侧生分生组织包括维管形成层 (vascular cambium) 和木栓形成层 (cork cambium)。

植物干细胞是生长发育的源泉和信号调控中心。它是未分化的细胞, 具有很强的自我更新和持续分裂能力, 是拥有永久生存能力的“不朽细胞”^[17-18]。

收稿日期: 2013-05-17

基金项目: 学科与研究生教育——食品学科特色教学科研创新平台建设 (PXM2012-014213-000063)

作者简介: 徐春明 (1978—), 男, 副教授, 博士。研究方向为食品与生物化工。E-mail: xucm78@163.com

更重要的是它们能够分化产生所有的地上和地下器官,并根据内外环境和调控信号决定其生长、成熟和衰老等生物学过程^[19]。另外,植物干细胞还可以通过自我凋亡防止遗传性损伤,避免将有缺陷的DNA遗传下去,从而保护植物不受恶劣环境的影响。

2 植物干细胞培养技术

植物干细胞培养技术是利用干细胞生长和遗传特性方面的优势,在传统细胞培养的基础上,以植物干细胞为目标,诱导、分离和培养外植体,建立相应的干细胞体系^[16]。

植物干细胞培养主要有3个步骤:(1)从植物中获得含有形成层的组织;(2)将含有形成层的组织在培养基中培养;(3)从形成层中分离细胞,从而获得形成层来源的干细胞。但根据目标干细胞的不同,目前主要有3种干细胞培养方法。

2.1 主要用于木本植物形成层干细胞的获得

以植物的新生枝条为外植体,表面灭菌后剥离木质部获得含有形成层、韧皮部、皮质和表皮的组织,在分离培养基上培养,培养30 d后,新生的形成层干细胞与脱分化的愈伤组织分离,将获得的形成层干细胞转移到生长培养基上培养。本方法可被应用于多数木本植物。目前,红豆杉和银杏已经成功建立了该类干细胞培养体系^[16]。

2.2 主要用于草本植物储藏根形成层干细胞的获得

通过对主根进行消毒灭菌,获得含有形成层的无菌薄片并进行高渗处理,使分化组织(皮层、韧皮部、木质部、髓部等)失去活性,仅保留形成层的活力。转移至诱导培养基中培养至有细胞长出,然后将外植体继代到生长培养基,培养10~20 d后,即可分离得到形成层干细胞,所得干细胞在同样的培养基上继代培养。本方法可被应用于大部分具有储藏根的草本植物,如轮叶党参 *Codonopsis lanceolata* (Sieb. et Zucc.) Trautv.、羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang、桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.、野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi、人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 等。目前,人参已经成功建立了该类干细胞培养体系^[20]。

2.3 主要应用于植物根部静止中心干细胞的获得

收集无菌苗含有静止中心的根组织,去掉根冠,从切口开始截取1 mm长作为外植体,将外植体放入诱导培养基,培养30 d后,静止中心干细胞由于与其他根部组织细胞的不同,两者自然分离,将获

得的静止中心干细胞转移到生长培养基培养^[21]。理论上,此方法适用于任何植物。目前,利用该方法可得到一年生或多年生草本药用植物的干细胞系。

3 药用植物干细胞培养技术的优势

相对于药用植物细胞培养得到的细胞系来说,利用药用植物干细胞培养技术获得的干细胞系的细胞特征和生长特性有所不同,主要在以下几个方面表现出优势。

3.1 长期培养的优势

传统药用植物细胞培养需要经过脱分化过程,脱分化过程往往不彻底,出现部分分化现象;细胞不稳定,易出现体细胞突变现象,长期培养时,在培养初始阶段生长良好,但随着培养时间的延长,细胞生长速度降低,很多细胞出现褐变及死亡,细胞形态也发生变化;而药用植物干细胞培养的干细胞系在长期培养时,能保持稳定快速生长,形态也不会发生很大变化。

Jang 等^[20]研究表明来自人参形成层的细胞系白且易碎,能连续增殖直到培养11个月甚至更久,生长速度比来自人参子叶的细胞系快,生长状况和聚集程度也很稳定。而来自人参子叶的细胞系为黄色,在培养初期细胞数量可在4周内增加2倍,但是培养5个月以后,其生长速度降低,开始出现黄色细胞、白色或者浅灰色含水细胞、褐色细胞及其他类似的不再增殖的细胞,并逐渐褐化死亡。

将紫杉针叶、胚芽和形成层的细胞系分别接种在合适的培养基中培养,每2周继代1次,同时分析记录3种细胞系的干质量。22个月后,形成层细胞系的细胞干质量远远大于针叶和胚芽细胞系,分别增加了4 000倍和3 000倍^[16]。Paek 等^[22]研究表明,来源于青蒿和菊花形成层的干细胞在长期培养过程中能保持稳定的生长率和较低的聚集度。Yu 等^[23]对比研究了番茄干细胞培养和普通细胞培养的区别,发现来源于茎的愈伤组织在长期培养过程中生长速度和生长方式发生了明显的变化,而且细胞有很高的聚集度,许多细胞变褐坏死,不能进行稳定的长期培养;而来源于形成层的干细胞在长期培养过程中生长速度和生长方式没有明显的变化,细胞聚集度也较小,能进行稳定的长期培养。

另外有研究^[21]发现在培养一些草本植物根部静止中心以外组织16周以后,细胞团中可清楚观察到不定根的形成,而来自静止中心的细胞系在培养

16周没有出现形态上的变化。由以上研究可知,利用形成层干细胞技术进行药用植物规模化生产可以获得更高的细胞生长量,同时由于干细胞在长期培养过程中所具有的较高的遗传稳定性,使得干细胞技术更能适应药用植物细胞培养规模化生产。

3.2 细胞悬浮培养的优势

当植物细胞以细胞团的形式而不是作为单个细胞被培养时,这种细胞团由于内外环境的差异,导致细胞生长发生变化。因此,在建立细胞的悬浮培养时,细胞的聚集度越低,越有利于细胞的生长。

Jang 和 Park 等^[20,24]利用光学显微镜分别对人参

和紫杉的干细胞培养和传统细胞培养得到的细胞系的细胞聚集度进行定量,结果如表1所示。另外,银杏和番茄干细胞在悬浮培养时,大部分以单细胞存在,小部分以小尺寸的细胞团存在。在观察青蒿干细胞和来自胚轴外植体的愈伤组织的聚集形态时发现,干细胞在悬浮培养时的细胞主要以单细胞为主,还有一些聚集度较小的细胞团,而来自胚轴外植体的细胞在培养时多数是以较大的聚集体形式存在。此外,来自一些草本植物静止中心的细胞系在悬浮培养时单细胞群占98%,细胞团只有2%,而来自根部其他组织的细胞系单细胞群占10%,细胞团为90%^[21-23,25]。

表1 人参和紫杉细胞悬浮培养时的细胞聚集度

Table 1 Aggregation rates of ginseng and taxus cells in suspension culture

外植体来源		细胞聚集度 / %			
		大细胞团 ($>1.5 \times 10^3 \mu\text{m}$)	中等细胞团 ($1 \times 10^3 \mu\text{m}$)	小细胞团 ($400 \sim 1 \times 10^3 \mu\text{m}$)	单细胞群
人参	子叶	90	7	2	1
	形成层	0	0	5	95
紫杉	胚芽和针叶	60.0 ± 3.2	30.0 ± 3.3	7.0 ± 0.6	3.0 ± 0.9
	形成层	0	0	7.4 ± 0.8	92.6 ± 0.8

由此可见,利用植物干细胞培养得到的干细胞系绝大部分以单细胞存在,小部分以小尺寸的细胞团存在,最大凝集尺寸仅为500 μm ,而传统细胞培养的细胞系在悬浮培养时,大部分以细胞团形式存在,最大凝集尺寸甚至达到10 mm。这表明干细胞系在悬浮培养时能更好地生长。

在对2种细胞的形态学观察时发现,不同来源的细胞系细胞特征有所不同。人参形成层的干细胞系具有许多小液泡,而其子叶的愈伤组织只有一个或者少数几个大的液泡^[20];来自静止中心的细胞系的细胞核比来自其他根部组织的大,大约为2~4 μm ^[21];银杏形成层的干细胞系与其脱分化的愈伤组织相比,具有的液泡多且小,而且具有多个线粒体^[25];青蒿形成层的干细胞也具有多个液泡^[22]。

3.3 大规模培养的优势

在进行大规模培养时,细胞容易受生物反应器中剪切力和细胞聚集的影响出现生长速度降低等问题。来自形成层的干细胞系含有大量的液泡,对剪切力灵敏度低,并且具有较低的聚集性,细胞生长能力不会受到影响。

从人参形成层的干细胞系和人参子叶的细胞系在摇瓶中和3 L气升式生物反应器中悬浮培养的时间可以看出,来自人参形成层的干细胞系在生物反

应器中的生长速度相比于摇瓶并没有降低,而且比来自人参子叶的细胞系在生物反应器中的生长速度高约5~9倍。另外,来自人参形成层的干细胞系还可以在20 L的气升式生物反应器中培养^[20]。同时,研究者测定了银杏、番茄和青蒿在3 L容积的气升式生物反应器中其普通的愈伤组织和干细胞的生长速度和生长指数(GI),如表2所示^[22-23,25]。

表2 不同细胞在3 L气升式生物反应器中的生长状态

Table 2 Growing status of different cells in 3 L airlift bioreactor

细胞系		生长速度 / 倍	GI
银杏	干细胞	3.1	2.27
	愈伤组织	2.3	1.3
番茄	干细胞	6.3	5.32
	愈伤组织	1.9	0.9
青蒿	干细胞	2.87	1.87
	愈伤组织	1.33	0.33

另外,紫杉干细胞培养体系对各种类型(气升式、搅拌桨式)、各种规格(3 L、10 L、20 L、3 t)的生物反应器均具有良好的适应性,相对于脱分化细胞培养表现出优越的增长特性^[16]。这都表明来自形成层的细胞系可以在生物反应器中规模化生产。

3.4 细胞低温储藏的优势

在低于-70℃的超低温条件下,有机体内部的生化反应极其缓慢,甚至终止。因此,采取适当的方法将生物材料降至超低温,即可使生命活动固定在某一阶段不衰老死亡。当以适当的方法将冻存的生物材料恢复至常温时,其内部的生化反应可恢复正常。传统组织培养的细胞在低温储藏之后存活率低,且恢复生长能力的延迟期漫长,而来自形成层的干细胞系在低温储藏后存活率很高,并能较快地重新生长。

有研究比较了来自草本植物静止中心的细胞系和来自其他植物根部组织的细胞系以及银杏树皮组织中诱导的愈伤组织和银杏形成层来源的干细胞在低温储藏后的存活率,结果如表3所示^[21,25]。可以发现来自静止中心的细胞系的存活率远远大于来自其他根部组织细胞系的存活率;银杏形成层来源的干细胞在低温储藏后存活率大于银杏树皮组织中诱导的愈伤组织的存活率。

表3 不同细胞系在低温储藏后的存活率
Table 3 Survival rates of different cell lines after cryopreservation

	细胞系	存活率 / %
草本植物	静止中心	85
	其他根部组织	10
银杏	形成层	18.87
	愈伤组织	2.87

另外,在低温储藏后,来自人参子叶外植体的细胞系不重新生长,而来自形成层的干细胞系在4周以后开始重新生长并增殖^[20];来自紫杉形成层的干细胞系也可在冻存条件下保持良好的生命力。因此利用干细胞技术可以保存生产性能较好的药用植物细胞系,也可以用于珍稀濒危植物种质资源的保存。

4 药用植物干细胞培养技术的应用

药用植物干细胞培养作为一种新技术,解决了传统药用植物细胞培养的很多难题,可以应用在以下几个方面。

4.1 生产天然产物

植物干细胞培养技术不经历去分化过程,在长期培养时,细胞的生长率和生长模式稳定、凝集程度低、遗传稳定,克服了传统细胞培养细胞生长缓慢、产量低、成本高等问题,具备商业化生产的基

本条件,可以大量培养以生产有用的植物天然产物。

英国研究人员发明了利用紫杉干细胞低成本生产紫杉醇的方法^[16]。另外有研究表明,悬浮培养紫杉干细胞还可以生产松香烷型三环二萜、美丽红豆杉素A和美丽红豆杉素B(它们均被证实具有抗肿瘤活性^[26]),而且生产值远远大于传统脱分化细胞培养的生产值^[16,27],因此紫杉干细胞可能会为松香烷提供一个更好的来源。

对从其他植物中提取的干细胞进行培养的研究表明,这种技术还可以用来生产其他的重要产物,如利用植物干细胞培养技术培养人参干细胞以生产人参皂苷^[28]。用3 L的气升式生物反应器培养人参干细胞,发现其中的人参皂苷F2和七叶胆苷XVII的积累量明显高于传统细胞培养^[16,29-30]。另外,还可以利用青蒿干细胞培养技术生产抗疟疾药物青蒿素,利用银杏干细胞培养技术生产银杏黄酮等。相信在不久的将来,利用药用植物干细胞培养技术会为人类提供大量的活性天然产物。

4.2 开发药品、功能性食品或化妆品

药用植物干细胞培养技术培养干细胞获得的细胞产物的裂解液、提取物和培养物可以作为活性成分用于药品、功能性食品、化妆品中。

如来自野山参或人参形成层的植物干细胞系,其裂解液、提取物及其培养物作为有效成分的组合物,有以下功效:(1)增加肝炎病毒的s抗体(Blab)及e抗体(Heap),抑制肝炎病毒的增殖,预防和治疗肝疾病;(2)直接作用于癌细胞,抑制肿瘤的形成和生长;(3)有效增强具有先天免疫功能的NK细胞的活性,大大加快淋巴结细胞的增殖速度,增强后天免疫力;(4)抑制由UV辐射引起的活性氧,有效减少或抑制与衰老有关的因素,从而预防和抑制衰老;(5)有效增加CD4⁺T细胞等的数量,减少人类免疫缺陷病毒(HIV)数,防治由于免疫障碍引起的几率性感染、神经机能障碍等,预防和治疗获得性免疫缺陷综合征。因此可以将药用植物干细胞培养技术用于药制剂,也可以用于制备功能性饮料,还可以用于化妆品中,制备护肤液、乳液、营养霜、按摩霜和面膜等^[31-35]。

来自青蒿形成层的干细胞及其培养物不仅对脂多糖(LPS)诱导细胞释放NO有抑制作用,而且能抑制环氧合酶-2(COX-2)的表达,因此可以作为有效的抗炎成分应用于药品、化妆品中^[22];来自紫杉形成层或原形成层的细胞系,其溶解产物、提

取物及培养物可以诱导癌细胞死亡,并抑制肿瘤血管的生成,具有抗癌活性^[24];来自番茄形成层的干细胞及其培养物能抑制与老化相关的酶的生成,抑制效率高于改善皱纹效果很强的视黄酸^[23]。

4.3 建立细胞系库和种质资源的保存

建立细胞系库可使植物细胞采用类似动物细胞冻存-复苏的培养方法,解决植物细胞培养过程中的变异问题。该方法简单可行,但是一般的植物细胞冻存后存活率低,恢复生长能力的延迟期漫长^[36],因此限制了其在植物细胞培养中的应用。

来自形成层的干细胞系在低温储藏方面有优势,不仅有高的存活率,而且在低温储藏前后生长速度的差别不大,能稳定长期保存,具备了建立细胞系库的前提。此外,植物干细胞培养的建立方法多样,使该技术能普遍推广,因此药用植物细胞系库可以容纳的药用植物种类将非常丰富。细胞系库的建立不仅会使研究材料的供应得到缓解,使药用植物细胞系的研究周期缩短,而且将在药用植物种质资源的保存方面发挥关键作用。

4.4 用于基础研究等其他方面

除了以上应用,利用药用植物干细胞培养技术还可以进行药物代谢研究、遗传机制研究等,使利用药用植物干细胞培养生产活性物质更持久、更有效地进行下去。此外,植物干细胞研究中还有一些尚待解决的问题,例如模式植物拟南芥中发现的调控机制是否可以应用到其他植物上以及植物激素与植物干细胞的关系等。而且,药用植物干细胞技术可为探索植物干细胞功能提供一个重要的生物工具。

5 药用植物干细胞培养技术的展望

药用植物干细胞培养作为一种新技术,是植物细胞培养的一个新阶段,其为解决传统细胞培养遇到的问题提供了一个全新的解决方案。但是到目前为止,药用植物干细胞培养仍然存在着一些不足和疑问。如来源于人参形成层的干细胞系提取物和培养物的抗衰老和抗氧化活性不是依赖于人参皂苷的作用,而且植物干细胞培养得到的细胞系中含有与常规野山参细胞不同的活性成分。但是由形成层得到的干细胞系是否含有与常规野山参不同的活性成分,以及为什么会合成新的活性物质,这种新的物质是什么,这一系列问题目前尚未得到更为深入的研究。虽然已经利用植物干细胞培养技术成功得到某些药用植物的干细胞,但是植物不同,干细胞培养的建立方法也可能有所不同,因此还需要一定的

实验对目前的方法进行完善。另外,相关报道中显示诱导形成层的干细胞系时使用的激素是特定的。如诱导草本植物形成层的细胞系时需要添加3-吲哚乙酸(IAA)或3-吲哚丁酸(IBA),使得仅专一性地诱导形成层细胞分裂,可获得来自形成层的干细胞系。但是如果使用另一种植物激素诸如2,4-D、氯苯氧乙酸(CPA)和1-萘乙酸(NAA)处理外植体时,细胞系在所有组织中均被诱导。这说明不同植物激素对形成层干细胞的诱导具有选择性。因此如果能更好地了解生长素以及细胞分裂素调控形成层的分子机制,将更有利于药用植物干细胞培养中干细胞的诱导和增殖。

目前,药用植物干细胞技术由于各种原因还没有广泛应用。但是随着该技术的完善和推广,其巨大优势会逐渐显现出来,并将大大推动与之相关的食品、医药和化妆品等行业的发展。

参考文献

- [1] Koehn F E, Carter G T. The evolving role of natural products in drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4: 206-220.
- [2] Kolewe M E, Gaurav V, Roberts S C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology [J]. *Mol Pharm*, 2008, 5(2): 243-256.
- [3] 杨毅, 张勇, 王建美. 绿色生物技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [4] Bringi V, Kadkade P G, Prince C L, et al. Enhanced production of taxol and taxanes by cell cultures of *Taxus* species: US, 7264951 [P]. 2007-09-04.
- [5] Srivastava S, Srivastava A K. Hairy root culture for mass production of high-value secondary metabolites [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2007, 27: 29-43.
- [6] Suresh B, Bais H P, Raghavarao K, Ravishankar G A, et al. Comparative evaluation of bioreactor design using *Tagetes patula* L. hairy roots as a model system [J]. *Process Biochem*, 2005, 40: 1509-1515.
- [7] Pasqua G, Silvestrini A, Monacelli B, et al. Triterpenoids and ellagic acid derivatives from *in vitro* cultures of *Camptotheca acuminata* Decaisne [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2006, 44: 220-225.
- [8] Lorence A, Nessler C L. Camptothecin, over four decades of surprising findings [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 2735-2749.
- [9] Liu C Z, Zhao Y, Wang Y C. Artemisinin: current state and perspectives for biotechnological production of an antimalarial drug [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72: 11-20.
- [10] Roberts S C. Production and engineering of terpenoids in

- plant cell culture [J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(7): 387-395.
- [11] De Jesus-Gonzalez L, Weathers P J. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 21: 809-813.
- [12] Qu J G, Zhang W, Yu X J, *et al*. Instability of anthocyanin accumulation in *Vitis vinifera* L. var. *gamay* Freaux suspension cultures [J]. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2005, 10(2): 155-161.
- [13] Naill M C, Roberts S C. Cell cycle analysis of *Taxus* suspension cultures at the single cell level as an indicator of culture heterogeneity [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 90(4): 491-500.
- [14] Baebler S, Hren M, Camloh M, *et al*. Establishment of cell suspension cultures of yew (*Taxus x media* Rehd.) and assessment of their genomic stability [J]. *In Vitro Cell Dev B Plant*, 2005, 41: 338-343.
- [15] Kim B J, Gibson D M, Shuler M L. Effect of subculture and elicitation on instability of taxol production in *Taxus* sp suspension cultures [J]. *Biotechnol Prog*, 2004, 20(6): 1666-1673.
- [16] Lee E K, Jin Y W, Park J H, *et al*. Cultured cambial meristematic cells as a source of plant natural products [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(11): 1213-1217.
- [17] Laux T. The stem cell concept in plants: A matter of debate [J]. *Cell*, 2003, 113: 281-283.
- [18] Scheres B. The retinoblastoma-related gene regulates stem cell maintenancemaintenance in Arabidopsis roots [J]. *Cell*, 2005, 123(7): 1337-1349.
- [19] Baucher M, El Jaziri M, Vandeputte O. From primary tosecondary growth: origin and development of the vascular system [J]. *Exp Bot*, 2007, 58(13): 3485-3501.
- [20] Jang M O, Lee E K, Jin Y W. Plant stem cell line derived from cambium of herbaceous plant with storage root and method for isolation the same: America, US2010233813A1 [P]. 2010-09-16.
- [21] Yu Y M, Lee E K, Hong S M, *et al*. Plant stem cell line derived from quiescent center and method for isolating the same: America, US2010255585A1 [P]. 2010-10-07.
- [22] Paek J S, Jin Y W, Lee E K, *et al*. Plant stem cell derived from cambium of family asteraceae and method for the isolated culturing thereof: Europe, EP2436757A2 [P]. 2012-04-04.
- [23] Yu Y M, KIM S Y. Plant stem derived from cambium of family solanaceae, and method for isolating and culturing same: Europe, EP2436759A2 [P]. 2012-04-04.
- [24] Park J H, Lim M J, Lee D H, *et al*. Anticancer composition comprising plant stem cell line derived from *taxus* cambium or procambium: America, US20100272692A1 [P]. 2010-10-28.
- [25] Hong N J, Jin Y W, Lee E K, *et al*. Plant stem cell line derived from cambium of family ginkgoaceae and method for the isolation thereof: Europe, EP2436758A2 [P]. 2012-04-04.
- [26] Yang S J, Fang J M, Cheng Y S. Lignans, flavonoids and phenolic derivatives from *Taxus mairei* [J]. *Chin Chem Soc*, 1999, 46: 811-818.
- [27] Bai J. Production of biologically active taxoids by a callus culture of *Taxus cuspidate* [J]. *Nat Prod*, 2004, 67: 58-63.
- [28] Roberts S C, Kolewe M E. Plant natural products from cultured multipotent cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(11): 1175-1176.
- [29] Dan M. Metabolite profiling of *Panax notoginseng* using UPLC-ESI-MS. [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69: 2237-2244.
- [30] Reynolds L B. Effects of harvest date on some chemical and physical characteristics of American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) [J]. *Herbs Spices Med Plants*, 1998, 6: 63-69.
- [31] Jin Y W, Lee E K, Lim M J. Composition for preventing or treating diseases, containing plant stem cell lines derived from the cambium of *Panax ginseng* including mountain ginseng or ginseng as active ingredient: America, US20120189660A1 [P]. 2012-07-26.
- [32] 陈荣雨, 李恩景. 含有来自包括野山参或人参的人参类形成层的植物干细胞系为有效成分的用于预防或治疗癌症的组合物: 中国, CN 102209550 A [P]. 2011-10-05.
- [33] Jang M O, Lim M J, *et al*. Anti-aging or antioxidant composition containing plant stem cell line derived from cambium of *Panax ginseng*: America, US20110097310A1 [P]. 2011-04-28.
- [34] Lim M J, Jin Y W, Lee E K. Composition for enhancing immunity containing plant stem cell line derived from cambium of panax ginseng including wild ginseng or ginseng as an active ingredient: America, US20120039918A1 [P]. 2012-02-16.
- [35] Hong S M, Lee E K, Jin Y W. Composition for prevention or treating AIDS contacting plant stem cell derived from cambium of panax ginseng including wild ginseng or ginseng as active ingredient: Europe, EP2363137A2 [P]. 2011-09-07.
- [36] Menges M, Murray J A H. Cryopreservation of transformed and wild-type Arabidopsis and tobacco cell suspension cultures [J]. *Plant J*, 2004, 37: 635-644.