

丹参组织和细胞培养研究概况

中国医学科学院药用植物资源开发研究所真菌室(北京 100094)

姜广奋*

摘要 概述国内外丹参组织和细胞培养的研究、包括丹参的器官发生和试管苗的快速繁殖,丹参细胞的悬浮培养和固定化培养以及丹参的不定根培养。重点概述丹参悬浮和固定化培养细胞生产其有效成分的能力及其次生代谢的调节。

植物组织和细胞培养是植物生物技术的一个重要的组成部分,它除了对农业、林业、园艺等有重要意义外,对我国传统中草药的研究、开发和生产也有重要作用。它对于药用植物资源开发、种质保存、育种、种苗的快繁脱毒、有效成分的生物合成、生物转化以及人工大规模工业化生产等都有巨大潜力,显示出生物技术的优越性。

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 为常用重要中草药。丹参的非醌类化合物有较好的消炎抗菌作用,尤其对冠心病、心绞痛等心血管疾病有良好的疗效。许多治疗心血管疾病的中药配方和中成药,丹参都是主要成分之一,因此丹参的临床需要量大。此外丹参酮为红色色素,在化妆品生产方面也有一定开发潜力。应用细胞培养方法生产丹参的有效成分,作为植物药资源开发和生产的一种新技术、新方法,有较大的研究意义和实用意义。

杨乃博^[1]、刘涤^[2]、蔡朝晖^[3]研究了丹参的器官分化和植株再生。蔡朝晖等^[3]对丹参的快繁进行了较为系统和深入的研究。结果表明以丹参叶为外植体,接种在附加6-BA 0.5~1mg/L的MS培养基上出芽效果好。试管苗转移到1/2MS附加IBA 0.2mg/L的培养基上生根效果最好。此法可用于进行丹参试管苗的大量快速繁殖,对丹参的栽培生产有一定意义。

余沛涛等^[4]研究了植物苯丙氨酸解氨酶(PAL)在丹参细胞分化中的作用。在丹参愈伤组织分化过程中出现2个PAL活性高峰。第1高峰在分化或不分化培养基中都存在,似与组织分化无关。第2个高峰只存在于分化培养基中。PAL活性在即将或刚分化的组织中活性最高,可作为组织启动分化的指示酶。

陶璐璐等^[5]研究了愈伤组织细胞的固定化及其转化产物的特征。他们用海藻胶包埋丹参愈伤组织细胞,在LS+KT₀₋₁+NAA₁培养液中常温震荡培养一个月左右,可连续分泌丹参的主要成分——丹参酮ⅠA(tanshinone I_A)和隐丹参酮(cryptotanshinone)。固定化细胞的稳定性、产物的含量以及下游工艺的可行性等明显优于悬浮培养细胞。

1983年日本Nakanishi等^[6]在MS+D₁K₀₋₁固体培养基上建立了6个丹参细胞系,然后进行了液体悬浮培养,之后又转到MS+K₀₋₁但无2,4-D的液体培养基中培养。其中只有细胞系A能产生2种萜类—隐丹参酮和铁锈醇(ferruginol),其它细胞系(B-F)仅产生可观数量的铁锈醇。

1985年Miyasaka等^[7]用B-F中的一个细胞系(B)进一步研究了铁锈醇的生产。在无2,4-D的培养基中铁锈醇只在生长的延迟期和静止期产生,和活跃的细胞分裂成负相关。2,4-D能促进细胞生长但却显著抑制铁锈醇的产生。和2,4-D不同,IAA不能促进细胞生长,但能促进铁锈醇生产。光照对细胞生长影响不大,但却抑制铁锈醇的生产。

1986年Miyasaka等^[8]研究了丹参悬浮培养中铁锈醇和隐丹参酮的生物合成的调节。在驯化的(即不需加生长素就可正常生长)悬浮培养细胞中只在延迟期产生铁锈醇。而

*Address: Jiang Guangfen, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing

当向驯化的悬浮培养物中加入蔗糖后,在静止期也恢复了铁锈醇的产生。另外,他们还建立了两步培养法。先将细胞系B的驯化细胞在一般培养基MS+D₀₋₁K₀₋₁上培养,然后转到去掉Fe-EDTA或去掉Fe的MS+K₀₋₁,但无2,4-D的培养基中培养,这时细胞生长被完全抑制,而铁锈醇可在整个培养期间连续产生。细胞系A在连续继代培养中,产生的隐丹参酮逐渐减少。因此他们通过细胞团选择法选出了一高产细胞系A₅,并进行了两步培养。A₅在MS+K₁但无Fe-EDTA的培养基上,生长几乎完全被抑制,但却可连续产生隐丹参酮和铁锈醇。

Miyasaka等^[9]在丹参细胞固定化培养研究中发现,固定化培养细胞可连续产生隐丹参酮和铁锈醇。大部分(约74%)隐丹参酮分泌到培养基中,而大部分铁锈醇(约47%)则留在细胞中,38%分泌到培养基中。固定化培养细胞产生的隐丹参酮和铁锈醇分别为悬浮培养细胞的39%和61%。固定化细胞的再利用研究表明,随着固定化细胞使用次数的增多,其次生物合成能力逐渐下降。但这并不是因为固定细胞的死亡而引起,而可能是亲脂性次生代谢物的积累而产生的负反馈效应。当固定细胞转移到生长培养基中时,会出现活跃的细胞分裂,表明它们仍具有很高的生活力。

1987年Miyasaka等^[10]报道了营养因素对悬浮培养细胞中隐丹参酮和铁锈醇生产的影响。研究表明,蔗糖、氮源和硫氨酸(VB₁)对这些化合物的产生是必需的,磷酸盐、MnSO₄和激动素表现出轻微的有益的影响。MS培养基的所有其它成分,对这些化合物的生产都是非必需或有抑制作用的。据此,他们设计出一种简化的隐丹参酮生产培养基。

1991年Shimomura等^[11]报道了丹参不定根培养物中丹参酮的生产和丹参苗的再生。在含有不同激素组合的Gamborg B₅固体培养基上建立的丹参不定根培养物在不同培养条件下,产生了4种主要的丹参酮类。在IAA或NAA配合有或无BA的Gamborg B₅培养基中,不定根生长很快。当加入IBA于培养基中时,得到了丹参酮的最高生产量。液体培养基中,不定根培养物的丹参酮含量超过80mg/g DW(6倍于亲体植物根中的含量)。另外他们还建立了丹参的快速繁殖,试管苗移栽到大田里后,6个月龄的丹参根产生的丹参酮比商品丹参根(通常来自3~4年龄植物)高。

目前在以有效次生物质生产为目的的药用植物组织和细胞培养领域中,出现了一些很有效的新方法,如加入各种诱导子,用发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 和根瘤农杆菌 *A. tumefaciens* 感染植物建立发根培养系统和冠瘿瘤培养系统,用DNA重组技术转移来自其它生物,如动物、微生物等的有用基因进入植物细胞,以期通过转基因植物或培养的转基因植物细胞来生产各种有用物质,如肽类药物、胰岛素等。随着这些新技术用于丹参细胞培养,将会使丹参细胞培养研究有一个新的进展。

参 考 文 献

- 1 杨乃博.植物生理学通讯,1985(8):53
- 2 王建英,等.植物生理学通讯,1987(6):46
- 3 蔡朝晖,等.中国药科大学学报,1991,22(2):65
- 4 余沛涛,等.植物生理学报,1987,13(1):14
- 5 陶璐璐,等.生物工程学报,1990,6(3):218
- 6 Nakanishi T, et al. Phytochemistry, 1983, 22(8):721
- 7 Miyasaka H, et al. Phytochemistry, 1985, 24(9):1931
- 8 Miyasaka H, et al. Phytochemistry, 1986, 25(8):637
- 9 Miyasaka H, et al. Phytochemistry, 1986, 25(7):1621
- 10 Miyasaka H, et al. Phytochemistry, 1987, 26(5):1421
- 11 Shimomura K, et al. J Nat Prod, 1991, 54(6):1583

(1993-05-07收稿)