

不同种类红豆杉愈伤组织的诱导及紫杉醇含量的差异[△]

中国医学科学院

中国协和医科大学 药物研究所 (北京 100050) 陈永勤* 朱蔚华** 吴蕴祺 胡 秋

摘要 研究云南红豆杉、东北红豆杉、红豆杉、南方红豆杉和杂种红豆杉形成愈伤组织的一些因素,比较不同植株来源的愈伤组织系的生长特点和紫杉醇含量。通过考察愈伤组织形成的时间和比率来研究取样时间、光照条件、培养基中 2,4-D 浓度和外植体类型对愈伤组织诱导的影响,用高效液相色谱法测定愈伤组织中紫杉醇含量。愈伤组织形成的迟早和比率在不同种类红豆杉之间和同一种类不同植株之间差异较大。在黑暗中,在添加有 0.1 mg/L BAP 和 1.0~3.0 mg/L 2,4-D 的 B₅ 培养基上,50%~100% 的云南红豆杉、红豆杉、南方红豆杉、杂种红豆杉和春、夏季取样的东北红豆杉的茎段可以形成愈伤组织;云南红豆杉和红豆杉愈伤组织系的紫杉醇含量普遍比较高,因此,这两种红豆杉可作为获得高紫杉醇含量愈伤组织系的外植体源。

关键词 红豆杉属植物 愈伤组织诱导 紫杉醇

Differences in Callus Induction and Taxol Contents of Several Yew (*Taxus* L.) Species

Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College (Beijing 100050)

Chen Yongqin, Wu Yunqi and Hu Qiu

College of Life Sciences, Hubei University Zhu Weihua

Abstract Factors affecting callus induction of *Taxus yunnanensis*, *T. cuspidata*, *T. chinensis*, *T. chinensis* var. *mairei* and *T. media* were studied and the growth characteristics and taxol contents in the callus strains derived from different plants compared. Effects of sampling times, illumination, 2,4-D concentrations in medium and explant types on callus induction were studied by examining callus formation time and rate; HPLC method was used to determine taxol contents in callus cultures. 50%~100% of the stem segments of *T. yunnanensis*, *T. chinensis*, *T. chinensis* var. *mairei*, *T. media* and *T. cuspidata* sampled in spring or summer formed calli very well when they were cultured in dark on B₅ medium supplemented with 0.1 mg/L BAP and 1.0 mg/L 2,4-D. Generally, taxol contents in the callus strains of *T. yunnanensis* and *T. chinensis* were higher, so these two *Taxus* species can be used as the first choice explant source to obtain high taxol content callus strains.

Key words *Taxus* L. callus induction taxol

紫杉醇 (taxol) 是从红豆杉属植物 (*Taxus* L.) 中分离出来的一个二萜生物碱,具有抗多种肿瘤活性。由于红豆杉属植物生长非常缓慢,极少成林,资源十分有限;再加之植物体内紫杉醇含量很低(约为树皮干重的 0.02%),所以应寻找解决该问题的方法。用红豆杉属植物组织培养技术生产紫杉醇被认为是一种有潜力的方法。

虽然人们已对多种红豆杉进行了愈伤组织的诱导和培养^[1],但对不同植株的愈伤组织诱导情况及愈伤组织中紫杉醇含量差异的比较报道甚少^[2]。本试验研究了影响云南红豆杉 *T. yunnanensis* Cheng et L. K. Fu 东北红豆杉 *T. cuspidata* Sieb. et

Zucc.、红豆杉 *T. chinensis* (Pilger) Rehd.、南方红豆杉 *T. chinensis* var. *mairei* Cheng et L. K. Fu 和杂种红豆杉 *T. media* Rehd. 愈伤组织形成的一些因素,并比较了不同植株来源的愈伤组织系的形态特点、生长速率和紫杉醇含量的差异。

1 材料与方法

1.1 试验材料:云南红豆杉、东北红豆杉和南方红豆杉的枝条取自本所的盆栽植株;杂种红豆杉枝条系方起程研究员从加拿大带回;红豆杉的枝条取自四川省林业学校校园内的成年植株,无菌苗(6个月)由成熟胚离体萌发而来。夏季和秋季取当年生枝条,春季取前一年生老枝条。

* Address: Chen Yongqin, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing
陈永勤 男,博士,湖北大学生命科学学院副教授,主要从事重要经济植物的快速繁殖技术、药用植物细胞工程和有效成分的研究,曾完成了数种重要观赏兰花和杜仲的快繁技术的研究,目前正在从事红豆杉属植物和小丛红景天的组织培养工作。在国内外发表学术论文 20 余篇。

** 联系人

△本文在 1998 年 11 月中国药学会主办的全国红豆杉和银杏等药用植物基础及应用研究学术研讨会上交流。

1.2 外植体的消毒:枝条洗净后剪成小段,分别用 70% 乙醇和 0.1% HgCl₂消毒 2 min和 20 min,用无菌水漂洗 6次后,将茎段剪成长约 1.5~ 2.0 cm 的小段,斜插在诱导培养基上。杂种红豆杉的叶片剪成约 2.0 cm 长的小段,平放在诱导培养基上。

1.3 培养基:愈伤组织诱导培养基为 B₅培养基^[3]的无机盐,添加 100.0 mg/L 肌醇、1.25 mg/L 烟酸、1.0 mg/L 维生素 B₁、0.5 mg/L 维生素 B₆、20.0 g/L 蔗糖、1.0 g/L 水解乳蛋白、0.1 mg/L BAR、1.0~ 3.0 mg/L 2,4-D 琼脂 8.0 g/L。愈伤组织增殖培养基同诱导培养基,但无水解乳蛋白,2,4-D 浓度为 1.0 mg/L。培养基的 pH 值为 5.8。

1.4 培养条件:试验材料在黑暗或光照培养室中培养。培养室温度为 (22± 2) °C。光照培养时光照强度约为 1500 lx,光周期为 14 h。诱导结束时,将外植体上形成的较大块(直径 0.5 cm 以上)愈伤组织剥离下来,接种在增殖培养基上继代培养。

1.5 紫杉醇的测定:样品中紫杉醇含量的测定用高效液相色谱法^[4]。高效液相色谱条件为 Shimadzu LC-6A 高效液相色谱仪,Shimadzu SPD-6A 紫外检测器,Rheodyne 7725 进样阀和 Shimadzu C-R3A 积分仪;色谱柱为 Plantinum C₁₈柱(250 nm× 4.6 mm, 5 μm, Alltech, USA);流动相为甲醇-乙腈-水(25: 35: 45),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 227 nm。外标法计算得出。

2 结果与讨论

在诱导培养基上,云南红豆杉、东北红豆杉、南方红豆杉、红豆杉和杂种红豆杉均能形成愈伤组织。但愈伤组织形成的情况因红豆杉种类和植株不同而异,同时也受到 2,4-D 浓度、光照条件、采样季节和外植体类型的影响。

2.1 云南红豆杉愈伤组织的诱导:由表 1 和表 2 可以看出,几乎 100% 的云南红豆杉茎段都可以形成愈伤组织,但不同植株来源的茎段在愈伤组织形成的迟早和形成可继代愈伤组织的比率等方面差异较大。从 TY5 和 TY6 的茎段形成愈伤组织的情况来看,云南红豆杉以在 2,4-D 浓度为 2.0 mg/L 的培养基上和黑暗条件下诱导效果最好;早春取样的茎段形成愈伤组织的时间要比秋季取样的早得多。

2.2 东北红豆杉愈伤组织的诱导:2,4-D 浓度和取样季节对东北红豆杉愈伤组织的诱导影响很大(表 3)。秋季取样的 TC4、TC5 和 TC7 的茎段形成愈伤组织的比率随培养基中 2,4-D 浓度的增加而明显提高。东北红豆杉在秋季取样时不仅形成愈伤组织

的时间晚、比率低,而且大部分外植体上的愈伤组织在形成后不久就由淡黄色变成棕红色,停止生长,因而较难形成较大的愈伤组织块而进行继代培养。春、夏季取样的茎段是培养在 2,4-D 浓度为 1.0 mg/L 的培养基中,但形成愈伤组织的时间早、比率高,愈伤组织的颜色也浅,为淡黄色。

表 1 云南红豆杉不同植株的茎段形成愈伤组织的情况

植株	采样时间	2,4-D	接种 外植体数	形成愈伤组织	愈伤组织 形成率(%)	可继代愈伤 组织比率(%)
		(mg/L)		的最早时间(d)		
TY6	1995-10-06	1.0	12	18	100.0	66.7
		2.0	10	18	100.0	80.0
		3.0	14	18	100.0	57.1
TY5	1995-10-07	1.0	16	25	93.8	70.0
		2.0	11	25	100.0	90.9
		3.0	12	25	100.0	66.7
TY8	1995-10-24	2.0	20	17	100.0	70.0
TY7	1996-04-15	2.0	16	10	100.0	87.5
TY2	1996-04-24	2.0	31	15	100.0	90.3

注:外植体在黑暗中诱导, TY6、TY5 和 TY8 的诱导时间为 70 d, TY7 和 TY2 的诱导时间为 60 d。

表 2 光照条件对云南红豆杉的茎段形成愈伤组织的影响

植株	光照条件	接种外 植体数	形成最早	形成率 (%)	可继代愈伤 组织比率(%)
			时间(d)		
TY6	光	14	7	100.0	71.4
	黑暗	50	7	100.0	84.0
TY5	光	21	6	100.0	76.2
	黑暗	32	5	100.0	93.8

注:1996年 3月 22日采样;培养基中 2,4-D 浓度为 2.0 mg/L,诱导时间为 60 d。

表 3 东北红豆杉不同植株的茎段形成愈伤组织的情况

植株	采样季节	2,4-D	发生最早 时间(d)	形成率 (%)	可继代愈伤 组织率(%)	
		(mg/L)				外植体数
TC5	1995-10-12	1.0	17	24	25.0	16.7
		2.0	16	26	68.8	43.8
		3.0	13	24	76.9	61.5
TC4	1995-10-13	1.0	11	23	72.7	9.1
		2.0	10	23	50.0	20.0
TC7	1995-10-14	3.0	8	23	100.0	25.0
		1.0	14	36	7.1	7.1
		2.0	24	36	8.3	4.2
TC1	1996-04-20	3.0	15	34	33.3	26.7
		1.0	27	16	96.3	74.1
TC3	1996-06-10	1.0	23	10	100.0	68.0

注:外植体在黑暗中培养; TC5、TC4 和 TC7 的诱导时间为 90 d, TC1 和 TC3 的诱导时间为 35 d。

2.3 南方红豆杉、红豆杉和杂种红豆杉愈伤组织的诱导:南方红豆杉、红豆杉和杂种红豆杉的茎段都比较容易形成愈伤组织(表 4)。南方红豆杉以在 2,4-D 浓度为 2.0 mg/L 的培养基上诱导效果最好。红豆杉无菌幼苗的茎段要比以成年植株上的老枝条形成愈伤组织的时间更早、比率更高。杂种红豆杉的茎段

和叶片最早发生愈伤组织的时间没有差异,但叶片形成愈伤组织的比率要比茎段低得多。

表 4 南方红豆杉、红豆杉和杂种红豆杉愈伤组织的诱导

红豆杉种类	采样时间	外植体类型	2, 4-D (mg/L)	外植体数	最早发生时间 (d)	形成率 (%)	可继代愈伤组织率 (%)
南方红豆杉	1995-10-08	茎段	1.0	15	17	100.0	53.3
			2.0	12	17	100.0	75.0
			3.0	13	17	100.0	69.2
红豆杉	1996-03-14	茎段	2.0	28	14	89.3	71.4
		幼苗	1.0	20	6	100.0	100.0
杂种红豆杉	1996-11-23	茎段	2.0	16	21	100.0	100.0
		叶片	2.0	63	21	38.5	30.1

注: 外植体培养在黑暗中; 南方红豆杉、中国红豆杉茎段和杂种红豆杉的诱导时间为 60 d, 红豆杉幼苗的诱导时间为 35 d

2.4 不同愈伤组织系的形态特点、生长速率和紫杉醇含量的比较: 由表 5 可见, 分为 3 种类型: 1) 颜色浅、生长快、高度分散的愈伤组织系; 2) 颜色较深、生长较慢、呈颗粒状的愈伤组织系; 3) 颜色较深、生长慢、呈结实块状的愈伤组织系。第一种类型的愈伤组织系不产生紫杉醇或产生紫杉醇的能力极低, 而第二种和第三种大都能产生紫杉醇。云南红豆杉和红豆杉老茎段形成的愈伤组织系的紫杉醇含量普遍比东北红豆杉和杂种红豆杉的高。

3 小结

愈伤组织形成的迟早和比率在不同种类红豆杉和同一种类不同植株之间存在差异。但红豆杉属植物愈伤组织的诱导比较容易, 在本试验条件下, 50% ~ 100% 的云南红豆杉、红豆杉、南方红豆杉、杂种红豆杉和春、夏季取样的东北红豆杉茎段可以形成可继代的愈伤组织。在春、夏季采样时东北红豆杉的茎段比较容易形成愈伤组织, 而在秋季采样时则比

较困难。黑暗比光照更有利于愈伤组织的诱导。

表 5 不同红豆杉愈伤组织的形态特点、生长速率和紫杉醇含量的比较

愈伤组织系	形态特点	生长指数	紫杉醇含量 (% 干重)
TY5	浅黄色, 高度分散, 湿沙状	4.245±0.321	ND
TY6	淡黄至浅红色, 颗粒状, 比较松散	1.477±0.116	0.0236±0.0018
TY8	灰白至黄色, 结实的块状	0.976±0.075	0.0149±0.0010
TY2	灰白至黄色, 结实的块状	0.937±0.284	0.0153±0.0010
TY7	灰白至黄色, 结实的块状	1.107±0.086	0.0136±0.0017
TC5	棕红色, 颗粒状, 比较松散	0.883±0.172	0.0117±0.0006
TC7	深褐色, 颗粒状, 比较松散	0.648±0.115	0.0073±0.0005
TC1	浅黄色, 高度分散, 湿沙状	3.183±0.241	ND
TC3	黄色至褐色, 颗粒状, 比较松散	-	0.0035±0.0004
TCH1	黄色至褐色, 颗粒状, 比较松散	1.375±0.164	0.0168±0.0015
TCH2	黄色, 颗粒状, 比较松散	1.648±0.086	0.0053±0.0007
TCM	黄色至褐色, 颗粒状, 比较松散	1.452±0.133	ND
TM1	黄色至褐色, 颗粒状, 比较松散	1.736±0.147	0.0084±0.0009
TM2	黄色, 颗粒状, 比较松散	1.627±0.258	0.0025±0.0006

注: TY= 云南红豆杉; TC= 东北红豆杉; TCH= 红豆杉; 1和 2 分别代表由老茎和无菌苗诱导出来的愈伤组织; TCM= 南方红豆杉; TM= 杂种红豆杉, 1和 2 分别代表由茎段和叶片诱导出来的愈伤组织; ND= 未检测到。

由于云南红豆杉和红豆杉老茎段所形成的愈伤组织系的紫杉醇含量普遍比较高, 可以作为获得紫杉醇高含量愈伤组织系的外植体来源。

致谢: 杂种红豆杉枝条由本所植化室方起程研究员从加拿大带回, 方唯硕博士提供了紫杉醇标准品。特致谢意。

参考文献

- 1 陈永勤, 等. 植物生理学通讯, 1997, 33(3): 213
- 2 朱蔚华, 等. 中药材, 1999, 14(9): 5
- 3 Gamborg O L, et al. Exp Cell Res, 1968, 50: 151
- 4 Wu Y Q, et al. J Lig Chromatogr & Related Techol, 1997, 20: 3147

(1999-03-09 收稿)

我刊关于“论文摘要”的编写要求

根据国家标准“文摘编写规则”(GB6447-86)的要求, 我刊 2000 年对文摘的编写作如下规定。

摘要有 2 种基本写法: 1) 报道性摘要一般用于实验性科技论文; 2) 指示性摘要多用于综述性、资料性或评论性文章。

报道性摘要必须包括目的、方法、结果、结论四个要素(来稿要分项写清楚), 重点在后三项内容, 宜写得详细, 字数在 400 字之内。指示性摘要则突出第一项, 后三项可简写, 一般 200 字左右。

编写摘要请注意以下几点: 1) 要着重反映新内容和作者特别强调的观点; 2) 要排除在本学科领域已成常识的内容, 不要简单地重复题名中已有的信息; 3) 要用第三人称的写法, 不必使用“本文”、“作者”等作为主语, 应采用“对……进行了研究”等记述方法; 4) 结构严谨, 表达简明, 一般不分段落。缩略语、代号等除了相邻专业的读者也能清楚理解的以外, 在首次出现处必须加以说明。

另外, 英文摘要中所有作者都需要提供英文单位名称。

《中草药》杂志编辑部

· 信息与文摘 ·

雪松精油的抗炎机制

松科植物雪松 *Cedrus deodara* (Roxb) 是一种生长在喜马拉雅地区山坡上的美观常青树。古代印度传统医药认为其木油可治疗类风湿性关节炎,但缺乏科学依据。作者等前曾用角叉菜胶导致的大鼠足肿模型测得其有抑制组胺、5-羟色胺、前列腺素和白三烯等介质的作用。木材经水蒸气蒸馏所得精油主要含苯并环庚烷类倍半萜。

为进一步了解此精油的作用机制,作者等又用能抑制肥大细胞释放组胺的化合物 48/80 [N-甲基-(对甲氧基丙胺)]和甲醛的复合物 [和使膜不稳定而促发炎症的制霉菌素 (nystatin) 造成的大鼠足肿模型,以及对红细胞的溶血情况进行了研究。结果表明:雪松精油能抑制化合物 48/80 导致的足肿,说明其能使肥大细胞处于稳定状态。其对制霉菌素所引起的足肿也同样有抑制作用,说明其能使溶菌酶膜稳定。又测得雪松精油能抑制红细胞在低渗和受热下的溶血。由此推断,雪松精油的消炎作用可能是由于其膜稳定作用。

(史玉俊 摘译)

[Shinde U A, et al. Fitoterapia, 1999, 70: 251]

植物 *Vismia cayennensis* 中

连有异戊烯基的二苯甲酮类新化合物:

Vismiaphenones D~G

藤黄科 (*Guttiferae*) 植物被认为是具有 HIV 抑制活性的

天然产物的重要资源,曾从该科胡桐属 *Calophyllum* 的 *C. langiferum* var. *austrororiaceum* 中分离得到 (+)-calanolide A (I), 它是一个有专属性的 HIV-1 逆转录酶抑制剂,现在正在进行 I 期临床试验。另一新的 camboginol 类异戊烯化二苯甲酮抗 HIV 物——guttiferones 则可从该科藤黄属 *Garcinia* 或其它植物中获得。

作者对该科植物 *Vismia cayennensis* (Jacq) Pers 进行研究,以期发现新的具有生物活性的化合物。干燥植物叶 872 g 按照文献方法提取,得到 77.6 g 提取物。取其中 10 g 溶于水,分别用 hexane, MeOtBu, EtOAc 萃取, MeOtBu 萃取物再进行 Sephadex LH-20 柱层析, CH₂Cl₂-MeOH (1:1) 洗脱,发现第 2 流分具有活性。将该流分通过 HPLC 纯化,得到 4 个新化合物 vismiaphenones D~G (VII~X), 结构式均为连有异戊烯基的二苯甲酮类物质。

作者对这 4 个新化合物进行了初步的抗 HIV 活性筛选,发现只有 VII (图 1) 显示活性 (EC₅₀ 约为 11 mg/mL) 与 guttiferones 一样, VII 并不表现细胞保护作用,对 CEM-SS 宿主细胞反而具有细胞毒作用。

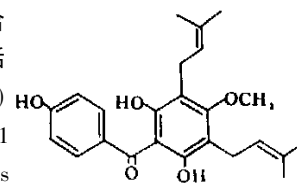


图 1 vismiaphenones D (VII) 的结构

(常海涛 摘译 史玉俊 校)

[Richard W F, et al. J Nat Prod, 1999, 62(1): 67]

(上接第 231 页)

可能与其抑制 TNF 的产生和活性有关

6 降血脂作用

动脉粥样硬化 (atherosclerosis) 是心、脑血管病的重要病理基础,血浆脂质代谢紊乱是动脉粥样硬化形成的重要危险因素。大量临床试验证明,血浆甘油三酯 (TC) 和低密度脂蛋白-胆固醇 (LDL-C) 水平升高或高密度脂蛋白-胆固醇 (HDL-C) 水平下降,都会使冠心病的危险性增加,与此相反,降低血浆 TC 和 LDL-C 水平或升高 HDL-C 水平,可延缓动脉粥样硬化病变的进展,减少冠心病的危险性。极低密度脂蛋白 (VLDL) 和 TC 可能不是独立的危险因素,但是它们与心血管病的死亡率也有明显联系,所以,调整和控制血脂水平是降低动脉粥样硬化发病率和死亡率的重要手段之一。水飞蓟素体外实验具有抑制 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 的作用。Krecman 等人^[25] 研究水飞蓟素对高胆固醇饮食小鼠引起血胆固醇过多症的抑制并以丙丁酚作对照药。其结果表明:水飞蓟素和丙丁酚对总胆固醇和 VLDL-C 和 LDL-C 及亚型 HDL_a 和 HDL_b 都有显著升高作用,

但丙丁酚只有降低作用。

参考文献

- Muriel P, et al. J Appl Toxicol, 1990, 10: 225, 281
- Raven M, et al. Arzneim Forsch, 1971, 21: 211
- Vogel G, et al. Toxicol Appl Pharmacol, 1984, 73: 355
- Letteron P, et al. Biochem Pharmacol, 1990, 39: 2027
- Carlos P, et al. Radicals Drug Dev Res, 1993, 29: 73
- Philippe L, et al. Biochem Pharmacol, 1990, 39: 2027
- Valengueta A, et al. Experientia, 1986, 42: 139
- Bindoli A, et al. Biochem Pharmacol, 1977, 26: 2405
- Valengueta A, et al. Biochem Pharmacol, 1985, 34: 2209
- 芮耀诚,等.中国药理学报,1990,11: 418
- Antonello P, et al. Gastroenterology, 1985, 109: 1941
- Dgle C, et al. Eur J Pharmacol, 1985, 2: 285
- Alarcon L, et al. J Pharm Pharmacol, 1992, 44: 929
- Fiebich F, et al. Experientia, 1979, 35: 1548, 1550
- Pueria D, et al. J Pharm Pharmacol, 1996, 48: 968
- 林爱友,等.中国药理学报,1989,10: 414
- Videla L, et al. Life Sci, 1982, 31: 2395
- Valengueta A, et al. Planta Med, 1989, 55: 420
- Ralando C, et al. Planta Med, 1989, 55: 417
- Ahmad N, et al. Biochem. Biophys Res Commun, 1998, 247: 294
- Zi A, et al. Cancer Res, 1998, 58: 1920
- Zi D, et al. Clin Cancer Res, 1998, 19: 1055
- Zi X, et al. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 239: 334
- 张俊年,等.药学报,1996,31: 577
- Krecman, et al. Planta Med, 1998, 64: 138

(1999-08-11 收稿)