

- [6] 王兆全,王先荣,杨志华.红藤化学成分的研究[J].中草药,1982,13(8): 7-9.
- [7] 苗抗立,张建中,王飞音,等.红藤化学成分的研究[J].中草药,1995,26(4): 171-173.
- [8] 李珠莲,梁国建,徐光漪,等.红藤化学成分研究[J].中草药,1984,15(7): 9-11.
- [9] 李珠莲,巢志茂,陈科.红藤脂溶性成分的分离和鉴定[J].上海医科大学学报,1988,15(1): 68-69.
- [10] 王瑞,耿培武,福山爱保,等.香花崖豆藤化学成分的研究[J].中草药,1989,20(2): 2-3.
- [11] 王瑞,耿培武,福山爱保,等.香花崖豆藤化学成分的研究(II)[J].中草药,1990,21(9): 5-7.
- [12] 曾仲奎,郑建,刘容华.岩豆凝集素寡糖链的纯化及组成研究[J].生物化学杂志,1992,8(5): 635-637.
- [13] Ishikura N, Yoshitama K. C-Glycosylflavones of *Mucuna sempervirens* [J]. Phytochemistry, 1988, 27(5), 1555-1556.
- [14] Yoshiyasu F, Yoshinori N, Geng P W, *et al.*. In vitro fibri-nolytic Phytosterols isolated from the roots of *Spatholobus suberetus* [J]. Planta Med 1988, (3): 34-36.
- [15] 韩桂秋, Chang M N, Hwang S B.红藤木质素的研究[J].中草药,1986,21(1): 68-70.
- [16] 周荣汉,杨星昊,唐正平等.中国油麻藤左旋多巴资源植物的研究[J].中药材,1998,11(3): 22-24.
- [17] 周长坚,许琳.鸡血藤注射液的抗生育和安全性试验[J].福建中医药,1988,19(4): 45-47.
- [18] 邵以德,张敖珍,张鹏,等.红藤的药理研究[J].中草药,1983,14(1): 23-26.
- [19] 陈鸿兴,陈滨凌,邵以德,等.红藤水溶性提取物对家兔实验性心肌梗塞的影响[J].上海第一医学院学报,1984,11(3): 201-204.
- [20] 陈鸿兴,邵以德,杨峻,等.红藤水溶性提取物对狗实验性心肌梗塞的作用[J].上海第一医学院学报,1984,11(5): 383-387.
- [21] 朱亮,林丹丽,顾春露,等.红藤水溶性提取物对血小板聚集、冠脉流量、血栓形成和 cAMP含量的影响[J].上海第一医学院学报,1986,13(5): 346-350.

黄芪培养系统的建立及皂苷合成的研究进展

崔月花¹,吴晓霞¹,夏铭^{2*}

(1. 扬州大学生物科学与技术学院 发育生物学系,江苏 扬州 225009; 2. 浙江大学生命科学院,浙江 杭州 310000)

摘 要: 概述国内外运用生物工程技术生产黄芪的次生代谢物黄芪皂苷和黄芪培养系统的一些基础研究及今后的展望。

关键词: 黄芪;培养系统;黄芪皂苷

中图分类号: Q813.1; R282.71 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)05-0464-03

Advances in studies on establishment of culture system and synthesis of astragaloside of *Astragalus* L.

CUI Yue-hua, WU Xiao-xia¹, XIA Ming²

(1. Department of Development, College of Biological Science and Biotechnology in Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu 225009, China; 2. College of Life Sciences in Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang 310000, China)

Key words *Astragalus* L. culture system; astragaloside

黄芪为中药上品,药用历史悠久,临床应用十分广泛,具有补气固表,利尿脱毒,敛疮生肌,益气补中之功效^[1]。现代医药研究表明,黄芪在细胞培养、动物及人体内均有一定的抗病毒感染作用,对抗体内干扰素系统有明显的刺激作用,可促进抗体的体液免疫和细胞免疫。目前随着保健药日益畅销,黄芪的用药量越来越大,天然资源甚感贫乏,加之黄芪栽培品种因病虫害的影响,品质和产量均有所下降。因此应用生物技术的方法生产黄芪的有效成分,作为植物资源开发和生产、减少占地的一种新技术、新方法有较大的研究和实用意义,是对药材生产的根本性改革。

黄芪的有效药用成分为黄芪皂苷^[2],如何提高培养物中有效成分的质量和含量,扩大培养规模,最终工业化生产这些物质,是这一研究领域的重点,笔者主要综述了黄芪组织、细胞培养,毛状根培养和药用的一些基础研究。

1 愈伤组织诱导和培养

1.1 外植体: 用于诱导黄芪愈伤组织的外植体为田间不同龄黄芪植株的根、茎、叶、花药、花蕾、未成熟种子、及由胚发育而来的子叶、胚轴等,其中嫩茎、幼叶及胚培养幼苗的各部分均是理想的外植体,愈伤组织经过不同时间的培养诱导率均为100%。李湘串等^[3]报道,未成熟种子及子叶外植体在

* 收稿日期: 2000-10-20

作者简介: 崔月华(1971-),女(蒙古族),内蒙古赤峰市人,1996年在内蒙古农牧学院获学士学位,1999年于东北农业大学获理学硕士。现任江苏省扬州大学生物科学与技术学院植物教研室助教。主要研究方向是植物次生代谢产物的研究。Tel (0514) 7979363

同种培养基上启动时间最早,仅经过 2 d 细胞开始膨大,5 d 后形成愈伤组织。我们的实验(未发表)表明外植体的取材时期对诱导愈伤组织影响极大。春季取材的田间叶片愈伤组织的诱导率可在 90% 以上,而夏季以后取材的叶片愈伤组织诱导率仅有 40% 左右,并且愈伤组织生长缓慢。

1.2 培养基:黄芪愈伤组织培养中使用效果较好的培养基有 B₅, MS, L 等,目前使用最多的是 MS 培养基^[4]。将 MS 培养基中的 MgSO₄·H₂O 含量由 370 降低到 74 mg/L,可使茎段愈伤组织的诱导率提高到 95%。培养基中附加椰乳(0.3%),可使愈伤组织中皂苷的含量提高 1.15 倍。张爱娟^[4]报道,在培养基中加入有机锗,可提高茎段与叶片的愈伤组织诱导率,而提高程度与培养基中 BA 含量有关,试验结果表明,在培养基中添加水解乳蛋白(LH 500 mg/L)对愈伤组织生长有明显促进作用。

1.3 植物激素:黄芪愈伤组织的诱导和培养必须在有激素的培养基中进行,NAA, IBA, IAA 和 2,4-D 均可诱导外植体产生愈伤组织,其中 2,4-D(1~2 mg/L)的效果最好^[4]。我们的试验结果表明,3~6 mg/L 的 IBA 诱导愈伤组织的效果与 2,4-D 的效果类似,所以可以用 IBA 代替 2,4-D,以消除 2,4-D 对人体的毒副作用。细胞分裂素和生长素配合使用,对愈伤组织诱导和生长都有明显的促进作用。GA₃ 对愈伤组织生长也有促进作用。

1.4 培养条件:我们在实验过程中发现 25℃ 左右适于黄芪正常生长和发育。张爱娟^[4]等发现,光培养与暗培养对愈伤组织的质地与生长差异比较大,暗培养下愈伤组织生长较快,但积累的干物质较少。散光在 500 lx 左右下诱导的愈伤组织质量较好,其生长速度和芽的分化率都较高。

1.5 皂苷含量分析:分析结果表明,黄芪愈伤组织具有合成黄芪皂苷的能力,而且由根诱导的愈伤组织含粗皂苷相同,而黄芪甲苷的含量高于其它外植的愈伤组织。在添加椰乳的培养基中生长的愈伤组织中总皂苷的含量高达 8%^[5],愈伤组织中总皂苷的含量比天然皂苷的含量高,但总糖含量与天然根中的含量相似。另外,锗的加入有利于提高愈伤组织中皂苷的含量,光培养下干物质比暗培养下多。

以上结果表明,黄芪愈伤组织可在不含 2,4-D 的培养基上诱导和培养,愈伤组织具有合成皂苷的能力,皂苷的含量高于天然黄芪根。因此,用愈伤组织培养方法生长黄芪皂苷在理论上是可行的,但是愈伤组织固体静止培养细胞增殖慢,不适于大规模培养。

2 黄芪细胞悬浮培养及大量培养

试验表明,黄芪细胞悬浮培养比固体愈伤组织培养生长速度提高近 70%,皂苷含量略有下降而多糖量略微增加,氮对黄芪细胞悬浮培养物中细胞生长的速度及皂苷的含量都有影响;将 MS 培养基中的 KNO₃ 含量提高 1 倍,同时去掉 NH₄NO₃,细胞的生长速度和皂苷产量比在正常 MS 培养液中提高 71.5% 和 151.2%。黄芪细胞悬浮培养收获皂苷的最佳时期为 20 d 以后,悬浮细胞合成皂苷高峰在细胞生长对数期稍后出现。另外,在细胞悬浮培养中加入几种生物因子

如蜜环菌、菜豆腐皮镰孢菌等真菌菌丝体能够促进皂苷的合成,是一些理想的生物诱导子。

黄芪细胞悬浮培养的结果为设计黄芪细胞工业化生产黄芪皂苷提供了科学理论依据。

3 发根培养系统

80 年代以来利用发根农杆菌培养大量毛状根在植物生物技术中有较大发展,并已广泛应用于药用植物组织培养中^[6~8,9,11~13]。Ri(*Agrobacterium rhizogenes*)质粒不仅可以用于植物基因载体,其转化产生发根在离体培养条件下还表现出激素自养型快速生长的特点,而且经常保持原植株的次生代谢物的合成能力。胡之璧等^[6]研究了黄芪发状根培养系统,发现叶片对 LBA 9402 较为敏感,感染率 21%,比其它菌株高。在毛状根大量培养时,MS 中的 NH₄NO₃ 表现出对黄芪毛状根生长的抑制作用,在无 NH₄NO₃ 的无激素 MS 培养基中,黄芪毛状根的生长量增加 20% 以上。蔗糖对毛状根生长的促进作用明显优于葡萄糖,3% 蔗糖支持生长量是 3% 葡萄糖的 2 倍多;当培养基的 pH 为 6 时,黄芪毛状根生长量达到最大值,而大于或小于此值时,其生长量均受不同程度的限制。与黑暗条件相比,在 1 000 lx 连续光照下,黄芪毛状根的生长受到一定的限制。在上述条件下,培养 26 d 黄芪毛状根的生长达到最大值,即干重 16 g/L。另外郑志仁^[6]等设计了不同体积(3, 5 和 10 L)的通气培养装置进行黄芪毛状根大规模培养,3 周后,证明 5 L 的装置接种量 30 g 鲜重时,毛状根的生长量为 10 g/L,与 Toivonen 等^[10]在气生式发酵罐中培养长春花毛状根的产量相近,对干燥根与毛状根中皂苷含量的分析表明,毛状根中粗皂苷的含量是干燥根中的 2.6 倍。

毛状根培养为大规模生产黄芪皂苷提供了一条新的可行途径,它和自然根具相同有效成分,但还应进一步提高培养物中有效成分的含量。

4 黄芪组织和细胞培养的基础研究

黄芪组织和细胞培养的基础研究主要是形态发生和植株再生,这些研究主要用于快速繁殖和育种。

4.1 不定芽的诱导:李湘串^[3]等发现未成熟种子、叶柄及未成熟子叶的愈伤组织不经转换培养基均可分化出芽,在不定芽长至 1~3 片真叶时转入生根培养基中生根,可形成完整植株。

4.2 胚状体的诱导:与诱导愈伤组织相比,诱导胚状体的培养基中不含细胞分裂素,在含有 2,4-D 2.0 mg/L 的培养基中加入 BA 0.1 mg/L 能明显降低胚状体的发生频率,水解乳蛋白(LH)、AgNO₃ 能促进胚状体的发生。

黄芪胚状体可在含 2,4-D 的培养基中形成并发育为成熟的胚状体,但若不及时移出则又重新愈伤组织化,并分化出更多的胚状体。胚状体的发生是不同步的,在同一块愈伤上可同时见到球形期、心形期、鱼雷形期和子叶期的胚状体。

成熟的胚状体在无 2,4-D 的培养基上可萌发生成绿色小植株,但胚状体萌发成植株的频率仍很低,为此,如何控制培养条件,使愈伤组织上形成大量正常、健壮、同步的胚状

体,进而提高再生植株的频率,是今后一个研究重点。

目前仍需解决的问题如下: 1)生产培养基的开发,目前使用的培养基多为培养生长而设计的,对次生代谢物的合成不一定合适。2)发展高产细胞株的选择技术,以缩短选择高产细胞株的时间。3)在发根培养系统中,皂苷含量有待提高。4)在诱导技术方面,寻找最佳诱导或刺激有效成分合成的方法。5)在育种方面,要积极开展花药培养、原生质体培养、细胞融合和转基因操作等方面的研究,以育出高产黄芪皂苷的黄芪新品系,丰富药用黄芪皂苷的种质资源。6)在快速繁殖方面,现在已经能够大量繁殖试管苗,关键问题是要改进试管苗移栽技术,提高试管苗的移栽成活率,这也是利用基因工程、细胞融合等技术培育新品种的必要基础。

随着各国对生物技术的投入增加以及人们对植物细胞的生理基础和遗传特征的深入了解,黄芪皂苷大规模工业化生产将成为现实。

参考文献:

- [1] 李旭明,王伟庆,刘琳.黄芪功效研究简述[J].山东中医药大学学报,1998,22(3):224-226.
- [2] 郑志仁,袁佑松,刘涤,等.黄芪毛状根的大量培养[J].植

- 物生理通讯,1997,33:133-134.
- [3] 李湘串,姜玉梅,苗淑霞,等.膜荚黄芪愈伤组织诱导及芽的分化[J].中草药,1992,23(12):644-646.
- [4] 张爱娟,吴文娟,吴乃居,等.内蒙黄芪的组织培养及有机锗对其作用影响的研究[J].中草药,1991,32(1):32-33.
- [5] 邢更妹.黄芪组织培养产生次生代谢产物多糖过程的研究[J].甘肃农业大学学报,1999,34(1):71-74.
- [6] 胡之璧,郑志仁,李幸平,等.膜荚黄芪毛状根培养系统的建立和外界因子对其生长的影响[J].植物学报,1998,40(5):448-452.
- [7] 费厚满,梅康凤,沈昕,等.发根农杆菌对绞股蓝的转化及毛状根中皂苷的产生[J].植物学报,1993,35(8):626-631.
- [8] 周立刚,杨崇仁,王君健.露水草毛状根的诱导和培养[J].云南植物研究,1996,18(3):336-340.
- [9] 张荫麟,吕桂兰,周新华,等.金荞麦发状根培养的研究[J].植物学报,1992,34(8):603-608.
- [10] Toivonen T, Ojaka M, Kauppinen V. Production of tropine alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica* [J]. Biotechnol Lett, 1990, 12: 519-524.
- [11] 邵德有,朱微.利用栝楼发根生产天花粉蛋白的研究[J].植物学报,1996,38(6):439-443.
- [12] 郑志仁,刘涤,宋纯清,等.黄芪毛状根化学成分和免疫功能活性的研究[J].生物工程学报,1998,14(2):153-157.
- [13] Toivonen T. Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites [J]. Biotechnol Prog, 1993, 9: 12-20.

植物药有效成分国际专利近况分析(I)

刘吉开*,杨雪*

(中国科学院昆明植物研究所 植物化学开放实验室,云南 昆明 650204)

摘要:总结了自90年代以来植物药有效成分的国际专利(还包括了海洋生物、动物和昆虫来源的有效成分),并对这些信息进行了整理和分析,以图表和化学结构的方式给出结果,同时对专利中的化合物类型分布、治疗领域分布以及相对分子量分布情况等相关问题作了简要讨论。

关键词:植物药;有效成分;国际专利

中图分类号:R282.71 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2001)05-0466-06

Survey on recent international patents of bioactive components of medicinal plants I

LIU Ji-kai, YANG Xue

(Department of Phytochemistry, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650204, China)

Key words medicinal plants; bioactive components; international patents

开发生产创新药物是一个国家医药创新能力和水平的体现,也是适应知识产权保护和医药产品市场国际化、发展民族医药产业的需要。我国传统中草药和各类有特色的民族药用的天然药物资源十分丰富,从中寻找先导化合物或药物并实现产业化,是我国新药开发工作的重要任务。作为新药研究和开发的一个重要环节,申请化合物专利保护是必需的。同时,从国际专利中吸取相关信息,对我们进行药物研究和开发也具有相当大的参考价值。我们可以从资源、化学和生物活性上

借鉴这些十分有价值的应用性成果,在不侵犯知识产权的前提下,对这些研究成果加以利用。这些专利信息即使不能直接加以利用,也会对我们拓宽思路、提供灵感以及把握信息等方面大有好处。为此笔者对手中掌握的90年代以后的国际专利加以整理,把有关植物、海洋生物、动物、昆虫中活性成分的结构、生物活性及其来源等加以归纳,而来源于微生物的活性成分专利由于数量过多,加之我国药物科技工作者涉及得不广泛而暂排除在外(表1,图1)。

* 收稿日期:2000-11-26

* Tel (0871) 5216327 E-mail: jkliu@mail.kib.ac.cn