

· 综述 ·

中草药植物细胞工程研究进展

刘 岭

(第二军医大学附属长海医院 中医科,上海 200433)

摘要: 简要介绍了植物细胞工程各主要分支学科在中草药研究中的应用及其进展情况。包括原生质体培养、单倍体育种、植物体细胞的种质保存、中草药植物细胞培养生产次生产物、植物快速繁殖技术、体细胞胚胎发生和人工种子等。

关键词: 细胞工程;中草药;组织培养

中图分类号: R282.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2002)12-1132-03

Advances in studies on plant cell engineering applied to Chinese herbal medicine

LIU Ling

(Department of TCM, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Key words cell engineering; Chinese herbal medicine; tissue culture

细胞工程是应用细胞生物学的方法,按照人们的预想方案,有计划地保存、改变和创造遗传物质的技术,亦即在细胞水平上对生物体进行创造设计。药用植物是我国传统中药的主要组成部分,近年来细胞工程技术在药用植物的研究中获得广泛的应用,并取得了一些进展。

1 原生质体培养

植物原生质体即除去细胞壁的裸露植物细胞。1960年, Cocking采用酶法游离原生质体获得成功,至20世纪80年代,原生质体培养已成为一个研究热点,其中药用植物的原生质体培养引人注目。目前,药用植物原生质体培养已扩展到包括夹竹桃科(Apocynaceae)、五加科(Araliaceae)、紫草科(Boraginaceae)等以及单子叶植物的天南星科(Araceae)和百合科(Liliaceae)的数十种植物,我国学者在该领域也进行了较为深入的研究。盛世红等^[1]在培养防风悬浮细胞的原生质体过程中,发现培养物的继代时间对原生质体产量和活力有很大影响;培养过程中,添加不含葡萄糖和任何生长调节剂的原生质体新鲜培养基能明显促进细胞分裂和细胞团体积增大;通过考察不同的酶组合对防风原生质体游离的影响,认为蜗牛酶能显著促进原生质体游离。同样是对伞形科植物,王济玫等^[2]报道了蜗牛酶的参与对前胡原生质体的游离有着显著的促进作用,由于蜗牛酶一般作用于 β -1,3糖苷键,在伞形科其他植物原生质体游离时,蜗牛酶的作用相似,故该实验结果暗示了伞形科植物的细胞壁可能普遍存在 β -1,3糖苷键的化合物。周延清等^[3]用决明子叶和下胚轴为材料,游离和培养原生质体,培养4d后,原生质体开始分裂,15d后其植板率约为19.2%,30d形成了细胞团或小愈伤组织。增殖愈伤组织在分化培养基上培养,可分化出芽。芽

在生根培养基上培养14d生根,从而再生决明小植株。研究还表明:Pectolyases Y-23是分离原生质体所必需的;用含2,4-D 0.4 mg/L(以下单位同),NAA 1.0与KT 0.1的KM8P漂浮培养利于原生质体的分裂。李继胜等^[4]从党参下胚轴愈伤组织中分离原生质体进行液体浅层培养,在合适的条件下,原生质体于6个月后形成小愈伤组织,小愈伤组织通过体细胞胚胎发生途径,再生了完整植株。

2 单倍体育种

单倍体植物的主要特点是其孢子体细胞的染色体数目和配子体细胞的染色体数目一致,因此可以从其“表型”观察“基因型”。单倍体植物本身一般并没有实际上的直接应用价值,但单倍体植株仅含一组染色体,易于选择,因而在育种实践上有其独特的优势,并且常常与其他育种技术相结合。1964年,Guha和Maheshwari培养毛叶曼陀罗花药获得了第一棵单倍体植株。目前,花药培养仍是单倍体育种的重要技术,由此获得的单倍体植株与其二倍体相比,生长发育较弱,体形较细小。曹有龙等^[5]采用枸杞花药进行离体培养,建立细胞系,诱导植株再生,所得到的再生植株矮小,生长慢,多白化苗,经细胞学鉴定 $n=12$,为单倍体植株。花药培养并非仅能获得单倍体,也会出现一定频率的非整倍体、混倍体、多倍体。沈光华^[6]利用离体培养得到石刁柏5个品种的花药植株并对该植株群体进行了倍性鉴定,统计结果表明花药培养植株群体倍性间的变异极为显著:单倍体仅占2.1%,二倍体占67.0%,多倍体占23.9%,非整倍体占6.4%。杜令阁等^[7]用MS, B₅, N₆, Miller改良怀特、尼许等6种基本培养基,加入不同种类和浓度的附加物质培养人参花药,连续4年得到了花粉植株,并建立了体细胞无性系,研究认为蔗糖

* 收稿日期: 2002-01-08

作者简介: 刘 岭(1973-),男,硕士,医师,第二军医大学附属长海医院医学硕士毕业,主要研究方向为抗肿瘤中药新药研究。
Tel 021-25070720 E-mail pt911322@guomai.sh.cn

是人参花药培养的必需成分,低温预处理能明显提高愈伤组织的诱导效果,通过染色体检查,观察到愈伤组织和根尖细胞中单倍体细胞($2n=24$)分别占 53% 和 48.6%,二倍体、非整倍体和混倍体占有相当比例。另外,邵启金等^[8]对人参花药植株再生及无性系建立亦进行了类似研究,认为 N_6 、Heller 培养基诱导效果较好,GA 和 LH 有利于人参花药愈伤组织的分化。

3 植物体细胞的种质保存

植物体细胞全能性的发现和证实,不仅为植物组织细胞的培养工作、细胞工程和基因工程开辟了广阔前景,也为植物的种质保存开辟了新的途径。许多植物的组织培养物在液氮中超低温保存以后,仍能保持相当高的存活率,并且能再生出新植株和保持原来的遗传特性。陈士云等^[9]对新疆紫草的愈伤组织进行超低温保存研究,发现经超低温处理后的愈伤组织生长虽然受到一定程度的抑制,但能够恢复正常生长。其酯酶与过氧化物同工酶谱未见显著变化。张治国等^[10]将铁皮石斛种子经不同时间脱水处理后投入液氮中保存,通过再培养试验考察影响超低温保存的一些主要因素,种子含水量降到 8%~18%,直接投入液氮中,经保存后,40℃水浴上快速解冻,种子萌发率为 92%~95%,与未经冷冻的种子的萌发率一致,并生长成正常植株。苏新等^[11]研究浙贝母愈伤组织的超低温保存方法,认为较好的冷冻保护剂是 10% 甲基亚砷+ 5% 甘油,以 1℃~5℃/min 的速度降温,从 0℃降至 -18℃,保留 1h,再降到 -40℃,停留 2h,投入液氮中贮存,解冻时以 40℃水浴迅速化冻效果较好,能成功地得到增殖及再生植株。

4 中药植物细胞培养生产次生产物

自 Bonner 报道了银胶菊植物组织培养物能产生橡胶以来,以组织培养技术生产植物次生产物方面已获得很大成就。迄今为止,已经研究过的 400 多种植物的细胞培养可以产生超过 600 种的成分,其中,具有药用价值的成分占了相当比例,许多重要的药用植物如紫草、人参、黄连、毛地黄、长春花、西洋参等细胞培养都十分成功,有些已实现工业化生产。在我国,对于人参中人参皂苷的生物合成方面的研究较为深入。刘长军等^[12]利用不同的真菌诱导子处理悬浮培养的人参细胞,发现尖孢镰刀菌培养液、黑曲霉、刺盘孢菌丝体壁表现出较高的诱导活性,均使人参细胞皂苷含量比对照提高了 30% 以上。另外,诱导子处理改变了人参皂苷的积累时程,使人参细胞皂苷积累高峰的出现提前,并促进细胞培养物中次生产物的外泌,同时增强细胞对蔗糖的摄取,吸收。

随着外源基因转化技术的成熟,利用根癌农杆菌和发根农杆菌的 Ti-质粒和 Ri-质粒转化后的冠瘿组织和毛状根作为培养系统来生产有用的植物活性成分是当今植物生物技术研究的热点之一。张荫麟等^[13]用发根农杆菌 15834、LBA9402 株和根癌农杆菌 C_8 株感染丹参无菌苗,诱导出毛状根和冠瘿瘤,使其在无激素培养基及光照条件下分化出丹参再生植株,以发根农杆菌转化的再生植株具典型毛状再生植物的特征,根癌农杆菌转化的再生植株株形高大,根系发

达,丹参酮含量高于原植物。发根农杆菌的 Ri-质粒中 T-DNA 转化并整合到植物细胞核基因组中而诱导产生的发根具有激素自主型生长特点,并保持原植物次生代谢物合成能力,常用于生产中草药有效成分的研究。常振战等^[14]以发根农杆菌 9402 菌株转化天山大黄,建立了发根离体培养系,以 HPLC 法测定天山大黄发根中多种蒽醌类成分,其中大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚-8-甲醚的含量均高于对照生药。蔡国琴等^[15]用发根农杆菌转化青蒿并建立了青蒿发根体外培养系统,通过检测不同理化因子对发根生长及青蒿素含量的影响,结果发现:光照有利于次生产物青蒿素的积累;当蔗糖浓度为 3%、培养基 pH 值偏酸性时,不仅促进发根生长,而且促进青蒿素的合成;低浓度 NAA 对发根生长具促进作用,但抑制青蒿素的合成;赤霉素 GA_3 对发根生长及青蒿素的合成都有促进作用。此外,黄炼栋等^[16]还研究了不同发根农杆菌菌株对小蔓长春花、穿心莲、刺果甘草等 6 种药用植物发状根形成的作用。

近年来,有关培养基 pH 值变化对培养细胞次生产物的产出影响方面的研究也较广泛。常振战等^[17]用生物反应器培养决明发根,并通过连续观察培养基 pH 值变化和连续测量培养基中游离蒽醌的含量,认为培养基 pH 值变化在一定程度上反映了反应器中游离蒽醌的合成情况。许建峰等^[18]报道了在高山红景天细胞悬浮培养过程中,降低培养基 pH 值能有效地诱导培养细胞中红景天苷的胞外释放,通过对红景天苷释放机制的探讨,认为红景天苷的跨膜运输是一个与 H⁺ 对运的动态过程,因而培养基 pH 值决定了红景天苷在胞内外含量的分布。

5 植物快速繁殖技术

在植物生物技术领域里,植物快速繁殖技术在生产上具有极大的应用潜力。欧美国家试管苗的年产量均在数千万株以上,且以每年 7%~8% 的速度增加。近年来,在我国关于药用植物的快速繁殖技术应用的报道越来越多。周延清^[19]研究了不同激素组合对芫荽腋芽再生植株与快速繁殖的影响,结果表明合适配比的激素组合对愈伤组织诱导芽的分化和快速繁殖均有增效作用。高山林等^[20]对徐长卿组织培养快速繁殖的试验表明,NAA 诱导愈伤组织的效果优于 IAA,而 IAA 较适于诱导丛生芽,BA 浓度有较明显的协同作用。中等浓度的激素和中等浓度的生长素配合较适于诱导植物细胞脱分化产生大量愈伤组织,而较高浓度的激素和较低浓度的生长素配组较适于诱导植物分化产生丛生芽和小苗,生根则只需单一添加中等以下浓度的生长素即可取得较佳的效果。杨联河等^[21]采用曲茎石斛的种子苗与茎段外植体苗不同培养基的双向培养,并对二者生长特点进行比较,发现外植体苗繁殖快,粗壮,但需植株量大,种子苗生长周期长,细弱,但培养基数高,认为二者结合培养对快速繁殖,提高成活率有利。曾宋君等^[22]还对铁皮石斛、美花石斛、无距石斛、广东石斛的种胚和茎尖进行离体培养和快速繁殖,此外,佟宏霞等^[23]建立了由栝楼腋芽→丛生芽→无根试管苗→再生根→再生完整植物→试管苗移栽成活的一套栝楼试管苗快

速繁殖体系。刘玉红等^[24]报道了太白贝母的快速繁殖技术,经测定,其愈伤组织与再生鳞茎中大多数人体所需常量和微量元素含量超过了栽培鳞茎。

6 体细胞胚胎发生和人工种子

体细胞胚胎发生是植物组织培养中形态建成的重要途径之一。通过体细胞胚胎发生途径形成再生植株的过程,不仅能充分说明植物细胞的“全能性”,而且还由于其具有繁殖速度快、繁殖系数高、染色体稳定以及单细胞起源等特点而受到普遍关注。尹东等^[25]以虎眼万年青子鳞茎的鳞叶为外植体,不经过愈伤组织阶段,直接诱导体细胞胚发生并再生植株。其体细胞胚形态学发育过程与合子胚相似。实验还观察到直接体细胞胚只产生与鳞叶的近轴面,而远轴面无体细胞胚产生。Asaka等^[26]将经过适当高温处理过的人参胚性组织培养在高糖浓度(100 g/L)的培养基(MS)上,产生了大量的人参胚状体,其数量是常规蔗糖浓度(30 g/L)所产生的10倍左右,葡萄糖与蔗糖具有相似的效应而甘露糖则无,将高糖浓度培养基上产生的人参胚状体培养在常规蔗糖浓度的培养基上可再分化成正常的小植株。郝建平^[27]对茴香胚状体发生的过程和组织细胞学特点进行了观察与描述,发现茴香胚状体的发育过程与合子胚基本相同,即由原胚形成的球形胚经过心形胚和鱼雷胚期最终发育成为子叶胚,研究还发现,细胞内淀粉粒的消长动态反映了胚状体发育阶段的转折和变化。

随着越来越多的植物被发现能够诱导产生大量胚状体,1978年, Murashige首次提出“人工种子”的概念。所谓“人工种子”就是由体细胞胚(胚状体)加上保护性外壳(人工种皮)及提供发育的营养(人工胚乳)组成的代替天然种子传播的一种结构。“人工种子”为包括药用植物在内的许多经济作物的育种和良种快速繁殖开辟了广阔的应用前景,但目前的研究仍以实验室阶段为主。郭顺星等^[28]以原球茎为材料,建立了铁皮石斛人工种子的初步制作流程,通过比较,认为以改良1/2 MS培养基附加蔗糖组成的人工胚乳可使人工种子的存活率、发芽率达到最佳水平,而且成苗整齐。而桂进等^[29]在诱导三七体细胞胚发生的实验中发现以IAA、NAA代替2,4-D对三七体细胞胚的诱导和分化有更好的效果,将该体细胞胚用4%海藻酸钠和2%氯化钙进行人工种皮包埋后,在无菌条件下,人工种子可转化成苗,转化率达89.7%。

参考文献:

- [1] 盛世红,陈惠民. 防风悬浮细胞的原生质体培养[J]. 植物学报, 1990, 32(4): 268-273.
- [2] 王济玫,陈惠民. 前胡原生质体再生植株[J]. 植物学报, 1991, 33(4): 261-266.
- [3] 周延清,苑保军,张根发,等. 决明原生质体的分离与培养研究[J]. 华北农学报, 1998, 13(3): 107-111.
- [4] 李继胜,贾敬芬,齐放军. 党参原生质体再生植株[J]. 植物学报, 1993, 35(11): 864-867.
- [5] 曹有龙,贾勇炯,陈放,等. 枸杞花药愈伤组织悬浮培养条件下胚状体发生与植株再生[J]. 云南植物研究, 1999, 21(3): 346-350.
- [6] 沈光华. 石刁柏花药培养植株群体的遗传多态性[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 1996, 25(4): 65-69.
- [7] 杜令阁,侯艳化,常维春,等. 人参花粉植株的诱导及体细胞无性系的建立[J]. 中国科学 B辑, 1987, 1: 35-41.
- [8] 邵启金,李安生,魏蓉蓉. 人参花药植株再生及无性系的建立[J]. 科学通报, 1986, 31(2): 143.
- [9] 陈士云,侯嵩生,叶和春,等. 外循环气升式反应器培养新疆紫草细胞[J]. 生物工程学报, 1994, 10(1): 81-86.
- [10] 张治国,刘骅,夏志俊,等. 铁皮石斛种子的超低温保存研究[J]. 安徽中医学院学报, 1997, 16(5): 40-42.
- [11] 苏新,方坚. 浙贝母愈伤组织超低温保存的研究[J]. 中药材, 1990, 13(12): 3-5.
- [12] 刘长军,侯嵩生. 真菌激发子对人参悬浮培养细胞的生长和人参皂苷生物合成的影响[J]. 实验生物学报, 1999, 32(2): 169-174.
- [13] 张荫麟,宋经元,祁建军,等. 农杆菌转化后丹参植株再生[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(5): 274-275.
- [14] 常振战,沈昕,果德安,等. 天山大黄根培养屋中萜醌化合物的产生[J]. 北京医科大学学报, 1998, 30(5): 413-415.
- [15] 蔡国琴,李国珍,叶和春,等. Ri质粒转化的青蒿发根培养及青蒿素的生物合成[J]. 生物工程学报, 1995, 11(4): 315-320.
- [16] 黄炼栋,胡之璧,章国瑛,等. 青蒿等6种药用植物发根的研究[J]. 上海中医药杂志, 1995, (8): 41-42.
- [17] 常振战,果德安,郑俊华,等. 用生物反应器培养决明发根合成游离萜醌化合物[J]. 北京医科大学学报, 2000, 32(2): 142-144.
- [18] 许建峰,刘传斌,方晓丹,等. 高山红景天细胞悬浮培养中pH值对红景天甙胞外释放及细胞活性的影响[J]. 植物学报, 1997, 39(11): 1022-1029.
- [19] 周延清. 芫荽腋芽再生植株和快速繁殖的研究[J]. 中草药, 1998, 29(11): 768-769.
- [20] 高山林,朱丹妮,徐德然. 徐长卿组织培养技术的研究[J]. 药物生物技术, 1995, 2(4): 33-36.
- [21] 杨联河,王倩嵘,石拓,等. 曲茎石斛组织培养研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(11): 658-659.
- [22] 曾宋君,程式君. 石斛的试管苗快速繁殖[J]. 中药材, 1996, 19(10): 490-491.
- [23] 佟宏霞,李喜文,邢苗. 栝楼组织培养和植株再生研究[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(12): 721-722.
- [24] 刘玉红,王善敏,王淑强,等. 太白贝母的快速繁殖试验[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(11): 15-17.
- [25] 尹东,黄百渠,李彦舫. 虎眼万年青的直接体细胞胚胎发生和植株再生[J]. 植物学报, 1997, 39(11): 59-63.
- [26] Asaka I, Li L, Hrotani M, et al. Mass production of Ginseng (Panax ginseng) embryoids on media containing high concentrations of sugar[J]. J Med Plant Res, 1994, 60(2): 146-148.
- [27] 郝建平,周小梅,李绍清. 茴香组织培养中体细胞胚胎发生的组织细胞学研究[J]. 实验生物学报, 1995, 28(3): 339-342.
- [28] 郭顺星,曹文岑,张集慧,等. 铁皮石斛人工种子制作流程及发芽研究[J]. 中草药, 1996, 27(2): 105-107.
- [29] 桂进,桂耀林,郭仲琛. 三七体细胞胚胎发生及人工种子研制[J]. 实验生物学报, 1992, 25(2): 139-141.