

铁皮石斛与绞股蓝原生质体融合的初步研究

魏小勇¹, 张 铭^{2*}

(1. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510405; 2. 浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310012)

摘要: 目的 探索铁皮石斛与绞股蓝原生质体杂交融合, 为中药材的改良提供新途径。方法 两种原生质体通过PEG法进行成对融合, 融合子培养在添加BA 2 mg/L 及NAA 1 mg/L 改良的MS液体培养基中。结果 分离得到了高产量、活力强、纯度高的铁皮石斛及绞股蓝叶肉原生质体。结论 融合获得了有活力的杂种细胞, 培养3 d后, 杂种细胞开始分裂, 共进行了3次分裂。

关键词: 铁皮石斛; 绞股蓝; 原生质体; 融合; 细胞分裂

中图分类号: R282.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2004)07-0811-04

Protoplast fusion in *Dendrobium candidum* and *Gynostemma pentaphyllum*

WEI Xiao-yong¹, ZHANG Ming²

(1. School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: **Object** To explore the protoplast fusion of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. and *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino. **Methods** The two kinds of protoplasts were fused by PEG method, and then cultured in the modified liquid medium containing 2 mg/L BA and 1 mg/L NAA. **Results** High yield, viability, and pure mesophyll protoplasts were isolated from *D. candidum* and *G. pentaphyllum*. **Conclusion** The first cell division occurs within three days after fusion. And some of the cells are divided three times.

Key words: *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.; *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino; protoplasts; protoplast fusion; cell division

铁皮石斛 *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. 为兰科石斛属名贵中药材, 具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳、明目强身等功效。现代药理研究表明, 铁皮石斛含有石斛碱、石斛次碱、6-羟基石斛碱等10多种生物碱和多种多糖物质, 具有抗肿瘤、抗衰老、增强机体免疫力、扩张血管及抗血小板凝集等作用, 因而铁皮石斛在中药复方和临床上被广泛应用^[1-6]。

绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 为葫芦科药用植物, 国内外学者从绞股蓝中分离出80多种绞股蓝皂苷(gypenosides, GP), 经药理和临床研究表明绞股蓝具有抗疲劳、抗衰老、抗溃疡、调血脂、提高免疫能力等功效, 还具有抑制原癌基因的表达而抗肿瘤、抑制肝微粒体脂质氧化而保肝、抑制血小板聚集和血栓素A₂、抑制胆石生成等作用。同时具有副作用小、作用缓和等特点, 是近

年来, 国内外广泛开发利用的重要中药材^[7,8]。

本研究利用原生质体融合技术构建铁皮石斛与绞股蓝远源杂交融合子, 进而培育具有双亲特性的杂种细胞, 期望通过培养杂种细胞大规模生产两类中药材的有效成分。

1 材料与方法

1.1 材料: 铁皮石斛原植株采自中国科学院广州植物研究所(叶秀麟研究员提供并鉴定), 将其种子培养在1/2MS培养基中诱导获得原球茎, 并诱导分化成苗, 获得试管苗^[5-6]。绞股蓝亦由中国科学院广州植物研究所提供, 取幼嫩茎尖置于MS+NAA 0.5 mg/L + BA 1.0 mg/L 培养基诱导获得愈伤组织, 在MS+NAA 0.2 mg/L + BA 0.1 mg/L 培养基中诱导获得试管苗^[7,8]。

1.2 方法

1.2.1 铁皮石斛与绞股蓝原生质体分离与纯化: 分

* 收稿日期: 2003-10-09

基金项目: 广东省中医药管理局资助项目(402003, 303005); 广东省科委重点科技攻关课题(9907802)

作者简介: 魏小勇(1969—)男, 湖南永州人, 讲师, 硕士, 主要从事中药生物工程研究。E-mail: jidewowxy@163.com。

别取铁皮石斛与绞股蓝试管苗叶片,自然萎蔫4~8 h,用尖头镊子撕去下表皮,覆盖在高渗酶液中(铁皮石斛的酶处理液组成:1.5%纤维素酶Onozuka R-10+1%果胶酶Pectinase(serva)R-10+0.5 mol/L甘露醇+3 mmol/L MES(吗啡啉乙磺酸)+0.2 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 5.6,用0.22 μm 混合纤维素微孔滤膜滤过除菌;绞股蓝的酶处理液组成为:2.0%纤维素酶R-10,1.5%果胶酶R-10,其余成分同铁皮石斛),温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,在5 r/min的摇床上,黑暗中酶解4~6 h。

原生质体的分离纯化采用滤过-离心法:用孔径为45 μm 的钢丝网滤过酶处理液。将滤液悬浮于4 mL 30%的蔗糖溶液中,在500 r/min下离心5 min,用吸管吸取位于两溶液界面的原生质体。用洗液(0.5 mol/L甘露醇+3 mmol/L MES+0.2 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 5.6)以400 r/min,离心3 min,共3遍。

以血球记数板统计所收集的原生质体的密度,并折算原生质产量(每克鲜重供体组织解离出的原生质体数量)。以FDA(荧光素二醋酸酯)检测原生质体活力(原生质活力=染色原生质体数量/观察原生质体数量)。以荧光增白剂M 2R检测原生质体脱壁情况。原生质体产量及活力的测定均设3次重复,每次重复统计5个视野,统计细胞数不少于500个。

将分离得到的原生质体用MS培养基制成 $1.2 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^5$ 个/mL悬液,于3.5 cm培养皿中液体浅层培养。

1.2.2 铁皮石斛与绞股蓝原生质体成对杂交融合:分别将铁皮石斛与绞股蓝原生质体悬液加在消毒载玻片上,在培养皿中加入大滴PEG融合液(30%PEG6000+0.1 mol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ +0.5 mol/L甘露醇),用微吸管分别从铁皮石斛与绞股蓝原生质体悬液中吸一个原生质体,释入融合液中使之成对融合^[9,10]。在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下轻轻摇动培养皿,镜下观察杂交融合过程。如此反复进行,获得多对原生质体融合体。用微吸管将逐对融合的原生质体加以富集,一起转移到前述洗液中洗涤2次,再用改良的MS培养基(添加BA 2 mg/L及NAA 1 mg/L)洗涤1次,并移入该培养基中, $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 黑暗中液体浅层培养。以FDA显示融合体的活力。以单独培养的双亲原生质体作对照。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛与绞股蓝原生质体分离及培养:分离得到了高产量、质量高、活力强、纯净的铁皮石斛与

绞股蓝试管苗叶肉原生质体。铁皮石斛原生质体产量为鲜重 4.7×10^7 个/g,相差显微镜下原生质体呈圆形,细胞均匀一致,胞质中可见大量叶绿体,且大多位于质膜边缘,颜色较深(图1-1)。FDA染色,荧光显微镜下活性原生质体发出明亮的黄绿色的荧光,表明其活性很好(图1-2),计算活力为89.3%。用荧光增白剂检测原生质体脱壁完好。将分离制得的叶肉原生质体制成 $1.2 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^5$ 个/mL的悬液,分别进行液体浅层培养及固体培养,结果,固体培养的原生质体2 d开始变色,细胞膜皱缩并逐渐破碎死亡。液体培养条件下,48 h仍有80%的活力,72 h开始再生细胞壁,80 h开始第1次分裂。随后褐化死亡失去活力。

而绞股蓝的叶肉原生质体相对较易分离,在静止条件下,即能获得活力较高的原生质体,其产量为鲜重 1.02×10^8 个/g,活力为93.2%。其形态与铁皮石斛原生质体相比较,差异较大:体积小、颜色浅、胞质中叶绿体分散、小而少(图1-3,4)。培养10 d未见分裂并死亡。

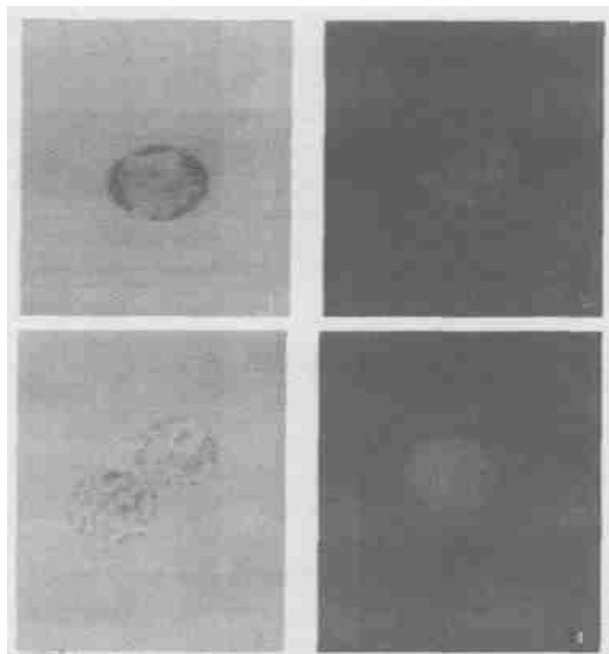
2.2 铁皮石斛与绞股蓝原生质体融合:轻轻摇动融合液,在PEG诱导下,可见原生质体接触、黏连,然后,2个原生质体发生猛地相向压缩,继而原生质体膜消失,直至融为一体(图2-1),整个融合过程大约6 min, FDA染色显示融合子具较强的活力。转入培养基中培养72 h左右可见杂种细胞第1次分裂并再生细胞壁(图2-2),细胞质变浓,整个细胞显得更饱满;84 h见第2次分裂形成4个细胞,此时第1次细胞分裂进入高潮,但此时细胞团开始变形,一侧微凸(图2-3);90 h见第3次分裂形成8个细胞,此时2次分裂细胞团一侧形成较长的突起(图2-4),可能是细胞开始分化。而对照组跟前述培养情况一致。

3 讨论

原生质体融合技术能使遗传基因高频率重组,克服杂交不亲和性,从而将植物中药有效成分的基因在不同种属间相互转移,从而集双亲优良性状于一体,达到改良中药材的目的。

本研究采用原生质体成对融合方法^[10],克服了群体融合方法的盲目性,从而排除亲本原生质体自体融合和多个原生质体融合,以及未融合原生质体的混杂。这样无须筛选系统,从而准确追踪观察融合过程及其发育分裂过程。

到目前为止,关于铁皮石斛与绞股蓝原生质体培养及体细胞融合国内未见成功报道。铁皮石斛为单子叶植物,原生质体培养成功非常困难,而原生质



1-铁皮石斛叶肉原生质体 2-铁皮石斛叶肉原生质体(FDA 染色)
3-绞股蓝叶肉原生质体 4-绞股蓝叶肉原生质体(FDA 染色)
1-mesophyll protoplast isolated from *D. candidum* 2-mesophyll protoplast isolated from *D. candidum* (stained with FDA) 3-mesophyll protoplast isolated from *G. pentaphyllum* 4-mesophyll protoplast isolated from *G. pentaphyllum* (stained with FDA)

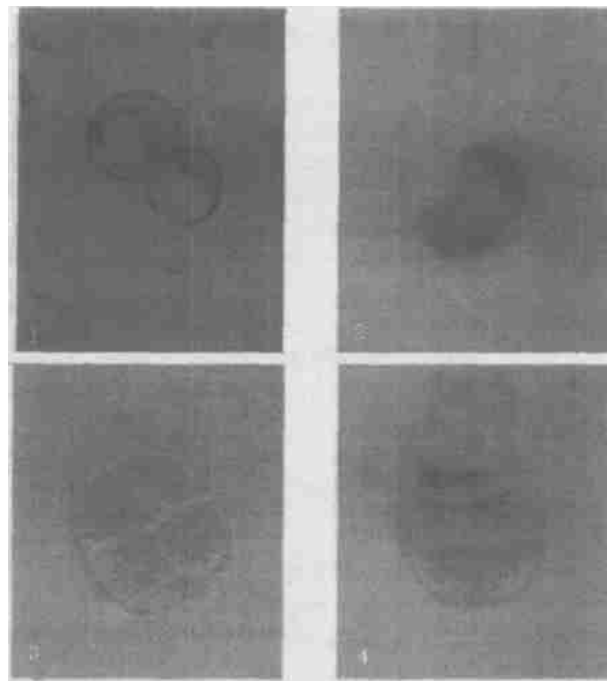
图 1 铁皮石斛和绞股蓝叶肉原生质体

Fig 1 Mesophyll protoplasts isolated from *D. candidum* and *G. pentaphyllum*

体融合则难度更大^[11]。笔者将亲源关系较远的两种药用植物原生质体融合成功获得杂种细胞并分裂,这在遗传上是一个突破。这可能与体细胞杂交中双亲的染色体通过消减而降低双亲遗传物质的不平衡有关,可能当双亲遗传物质在杂种细胞中达到平衡恢复分裂分化能力,说明这两种药用植物可能存在再生互补效应^[12]。此项研究可望为中药的改良提供一条新途径。

另一方面此项研究将生药学与细胞工程结合起来。近年,国内外许多科学家寻求生物工程来解决药用植物资源短缺问题,应用细胞工程实现商业化大规模生产天然药用成分。因此建立铁皮石斛与绞股蓝体细胞杂交细胞系,为采用生物反应器大规模培养该杂种细胞提供了依据,这样就有可能直接从杂种细胞提取药用成分,满足药材市场的需求,从而提高生产效率,为两种药材的工业化和商业化生产药用成分提供了技术基础。

另外杂种细胞分子鉴定及药用成分的分析比较正在进行中。



1-原生质体正在融合 2-杂合子第 1 次分裂(融合后 72 h) 3-杂合子第 2 次分裂(融合后 84 h) 4-杂合子第 3 次分裂(融合后 90 h)

1-protoplasts of *D. candidum* and *G. pentaphyllum* are fusing 2-first division (72 h after fusion) 3-second division (84 h after fusion) 4-third division (90 h after fusion)

图 2 铁皮石斛和绞股蓝原生质体融合及其分裂

Fig 2 Fusion of protoplasts of *D. candidum* and *G. pentaphyllum* and division of hybridization cell

References

- [1] Li M H. The determination of contents of the polysaccharides of *Dendrobium candidum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1990, 21(10): 10-12.
- [2] Setinder K, A inouche M L, Bayer R, et al. Selection of best medium for *in vitro* propagation of *Dendrobium lindleyi* Steud [J]. *Adv Plant Sci*, 1997, 10(1): 1-5.
- [3] Mujib A, Fushini H, Komatsu K, et al. Clonal propagation of *Dendrobium Madame Pampdour* through apical meristem culture [J]. *Adv Plant Sci*, 1994, 7: 340-346.
- [4] Wei Xi, Zhang M, Huang H, Advanced research on pharmacology value of *Dendrobium candidum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(Suppl): 189-191.
- [5] Zhang M, Wei X Y, Huang H R. A study on the solid encapsulating system of the artificial seed of *Dendrobium candidum* [J]. *Acta Horticult Sin* (园艺学报), 2001, 23(40): 20-23.
- [6] Zhang M, Zhu F, Wei X Y, et al. Both the effects of auxin on *D. candidum* embryos germination and of ABA on PLBs quality [J]. *J Zhejiang Univ—Sci Ed* (浙江大学学报·理学版), 2001, 27(1): 92-94.
- [7] Xu W Z. Contents of saponin in the tissue culture of the root of *Glynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino, medicine [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 1998, 14(3): 153-154.
- [8] Li C, Zhou L R. Effects of hormone on the peroxidase and

- the content of gypenoside in *Gynostemma Callus* [J]. *J Anhui Agric Univ* (安徽农业大学学报), 1998, 25(4): 448-451.
- [9] Huo L Y, Xiang F N, Xia G M. A symmetric somatic hybridization between *Peucedanum terebinthace* Fisch and *Bupleurum scorzonrifolium* Willd [J]. *J Shandong Univ—Nat Sci* (山东大学学报·自然科学版), 2000, 35(4): 464-468.
- [10] Sun M X, Yang H Y, Zhou C. Polyethylene glycol-induced fusion of selected pairs of single protoplasts [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1994, 36(7): 489-493.
- [11] Ding L, Fu T Z. Progress of study on biotechnology of orchid [J]. *J Northwest Normal Univ—Nat Sci* (西北师范大学学报·自然科学版), 1994, 36(7): 489-493.
- [12] Xiang F N, Xia G M, Chen H M. The studies on asymmetric somatic hybrid between wheat and *Avena* [J]. *Sci Sin (C)* (中国科学·C辑), 2002, 32(4): 299-305.

肉苁蓉药材与盐生肉苁蓉培养细胞的主要成分对比研究

赵琳¹, 郭志刚¹, 刘瑞芝¹, 孙素琴^{2*}

(1. 清华大学 化工系生物化工研究所, 北京 100084; 2. 清华大学 化学系, 北京 100084)

摘要: 目的 研究肉苁蓉药材与盐生肉苁蓉培养细胞的苯乙醇苷类成分差异。方法 利用傅里叶变换红外光谱(FTIR)和HPLC技术进行成分对比分析。结果 FTIR的分析结果表明, 盐生肉苁蓉培养细胞的红外指纹谱图与肉苁蓉药材具有一定相似性; HPLC的分析结果表明, 盐生肉苁蓉细胞中所含的主要成分和肉苁蓉药材相似, 只是含量有差异。结论 从整体上看, 盐生肉苁蓉培养细胞中所含成分种类较多, 且大部分含量较高, 其中洋丁香酚苷(类叶升麻苷)和松果菊苷的含量大幅度高于肉苁蓉药材。

关键词: 肉苁蓉; 苯乙醇苷; 高效液相色谱; 傅里叶变换红外光谱

中图分类号: R282.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)07-0814-04

Comparison of main constituents of *Herba Cistanche* and cultured cells of *Cistanche salsa*

ZHAO Lin¹, GUO Zhi-gang¹, LIU Rui-zhi¹, SUN Su-qin²

(1. Institute of Biology and Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering;

2. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: **Object** To study the difference of phenylethanoid glycoside between the cultured cells of *Cistanche salsa* (C. A. Mey.) Benth. et Hook. f. and *Herba Cistanche*. **Methods** Making comparison by means of FTIR and HPLC technique. **Results** Using the FTIR technique, the infrared spectrum of cultured cell of *C. salsa* was similar to that of native *Herba Cistanche* at a certain extent. The HPLC analysis indicated that the main chemical constituents in cultured cells of *C. salsa* were similar to that of native *Herba Cistanche* while considerable difference of constituents was found between them. **Conclusion** On the whole, there are much more constituents in the cultured cells of *C. salsa* comparing with the native *Herba Cistanche*. The content of echinacoside and acteoside in the cultured cells is much higher than that in the native *Herba Cistanche*.

Key words: *Herba Cistanche*; phenylethanoid glycoside; HPLC; FTIR

肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Ma 是列当科肉苁蓉属(*Cistanche* Hoffm. et Link)的多年寄生草本植物, 为我国传统的名贵中药, 始载于《神农本草经》, 列为上品^[1]。具有补肾阳, 益精血, 润肠通便等功能; 用于治疗男子阳痿, 女子不孕, 腰膝酸软, 筋骨无力, 肠燥便秘^[2]。近代药理学研究表明, 还能提高机体免

疫功能, 促进DNA合成, 增强体力, 提高智能, 具明显的抗衰老作用^[3]。肉苁蓉主产于我国的内蒙古、新疆、甘肃和宁夏一带^[1], 有“沙漠人参”之美誉, 其主要活性成分为苯乙醇苷类化合物^[4]。目前, 我国肉苁蓉药材基本来自野生资源, 其品质易受气候环境的影响, 近年来由于不合理的大量采掘, 加之寄生植物

* 收稿日期: 2003-10-19

作者简介: 赵琳(1980—), 女, 山东省烟台人, 清华大学化工系硕士研究生, 研究方向为植物细胞培养工程。 Tel: (010) 62785603
E-mail: zhao.lin98@mails.tsinghua.edu.cn