青蒿中青蒿素含量过低极大地制约了其规模化生产与临床应用。因此,利用基因工程对青蒿基因组进行敲入(knockin)和敲除(knockout)成为青蒿遗传改良的两大方向,其目标是提高青蒿素含量和促进青蒿的综合利用,前提条件是成熟而可靠的载体系统、转化方法和再生技术的建立。为此,国内叶和春研究小组建立了青蒿宿主-载体及其转化系统^[12]。本研究为进一步开展这方面的研究奠定了基础。

References:

[1] Shen M. The immunosuppression of artemisinin [J]. *Sci Sin (B)* (中国科学 B 辑), 1983, 10: 928-934.
 [2] Yang X P. The antitumor effect of artemisinin succinate [J]. *Cancer (癌症)*, 1997, 16: 186-187.
 [3] Gong S X. Inhibition of tri-*p*-coumaric arginamide and related amide compounds on HIV-1 proteinase [J]. *Foreign Med Sci—Chin Med* (国外医学·中医中药分册), 2002, 24: 302-303.
 [4] Vergauwe A, Cammaert R, Vanderberghe D. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia annua* L. and regeneration of transgenic plants [J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 15: 929-933.

[5] Chen D H, Meng Y L, Ye H C, et al. Culture of transgenic *Artemisia annua* hairy root with cotton cadinenin synthase gene [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1998, 40: 711-714.
 [6] Zeng Q P, Yang R Y, Feng L L, et al. Cloning and sequencing of human RANTES gene [J]. *Chin J Sex Trans Dis AIDS* (中国性病艾滋病防治), 2000, 14: 245-247.
 [7] Zeng Q P, Yang R Y, Feng L L, et al. Cloning sequencing and *in vitro* expression of human RANTES genes [J]. *Chin J Biotech* (生物工程学报), 2001, 17: 349-351.
 [8] Zeng Q P, Feng L L, Yang R Y, et al. Transient expression of recombinant human cytokine genes in transgenic *Artemisia annua* cells [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(1): 63-66.
 [9] Michael N L, Moore J P. HIV-1 entry inhibitors: evading the issue [J]. *Nature Med*, 1999, 5: 740-742.
 [10] Premack B A, Schall T J. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection [J]. *Nature Med*, 1996, 2: 1174-1178.
 [11] Zeng Q P, Yang R Y, Feng L L, et al. Establishment of stably expressed human RANTES gene in *Prunella vulgaris* cell clone [J]. *Chin J Biotech* (生物工程学报), 2003, 19: 168-173.
 [12] Chen D H, Ye H C, Li G F, et al. Expression of green fluorescent protein gene in transgenic shoots of *Artemisia annua* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1999, 41: 490-493.

稀土元素镧对掌叶大黄毛状根和非转化根生长及蒽醌产量的影响

杨世海¹, 刘晓峰², 果德安³

(1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林亚泰(集团)股份有限公司, 吉林 长春 130031; 3. 北京大学药学院, 北京 100083)

摘要:目的 研究不同浓度的稀土元素镧(La³⁺)对3种大黄根生物量和蒽醌次生代谢产物产量的影响。方法 采用统计学分析方法,研究稀土元素 La³⁺对两种掌叶大黄单克隆毛状根 DH5c、DH7a 和液体培养非转化根 NOR 生物量和蒽醌化合物合成的影响。结果 La³⁺浓度对大黄根生物量积累有显著影响,培养基中 La³⁺为 10 mg/L 时,对大黄根生长表现出明显的抑制作用;La³⁺浓度对3种大黄的蒽醌产量有极显著影响,当培养基中 La³⁺ 1.0 mg/L 时,蒽醌产量最高;经稀土离子处理的3种大黄根中芦荟大黄素和大黄素显著高于大黄素、大黄酚和大黄素甲醚。结论 培养基中添加适宜浓度的稀土离子 La³⁺对掌叶大黄单克隆毛状根的生物量积累和蒽醌类化合物的合成具有明显的促进作用。

关键词:掌叶大黄; 毛状根; 稀土元素; 蒽醌类化合物

中图分类号:R282.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2004)10-1171-04

Effect of rare-earth elements La³⁺ on growth of hairy roots and normal roots of *Rheum palmatum* and their yield of anthraquinone

YANG Shi-hai¹, LIU Xiao-feng², GUO De-an³

(1. College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Jilin YaTai Group Co., Ltd., Changchun 130031, China; 3. School of Pharmacy, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Object** To study the effect of rare-earth elements La³⁺ on growth of hairy roots and normal roots of *Rheum palmatum* L and their yield of anthraquinones. **Methods** The biomass and an-

收稿日期: 2004-01-16

作者简介: 杨世海(1962-),男,吉林人,副教授,博士后。1983年7月毕业于吉林农业大学中药材学院,1995年9月—1998年11月在北京医科大学药学院(现北京大学药学院)攻读博士学位,2000年12月—2002年12月在日本国立农业生物资源研究所做日本科学技术振兴事业团博士后(STA Fellow)研究,主要从事中药资源和中药生物工程研究。
 Tel: 0431-4533086 Fax: 0431-4512151 E-mail: jlyangs@yahoo.com.cn

thraquinone yield of two hairy clones DH5c, DH7a, and normal root NOR cultures of *R. palmatum* were evaluated statistically after various concentration of La^{3+} were administrated into culture medium. **Results**

Significant differences of biomass yield and anthraquinone yield were shown among six La^{3+} concentrations, in which 10 mg/L showed obvious inhibitory effect for root growth and 1.0 mg/L was the best for anthraquinone yield. In general, aloë-emodin and rhein were predominant in five anthraquinones after treated with the rare-earth element. **Conclusion** The growth of hairy root cultures of *R. palmatum* and their anthraquinone yield are greatly promoted by addition of La^{3+} to the medium.

Key words: *Rheum palmatum* L; hairy root; rare-earth element; anthraquinones

稀土是具有生理活性的化学元素,稀土元素在一定条件下,确有促进植物对养分的吸收、转化和利用等营养生理作用^[1]。有利于提高作物产量和改善农作物品质,在农业上得到广泛应用。稀土可以提高人参中总皂苷的含量,能使茶叶中氨基酸和儿茶素的含量增加,咖啡碱的含量降低。苹果在喷施稀土后,果实中花青苷的含量增加 2~3 倍,能提前 10~20 d 着色^[2]。稀土元素应用在细胞和组织培养中已有报道。在培养基中附加低浓度稀土元素 Eu^{3+} 对大黄愈伤组织生长具有明显的促进作用^[3]。黄连愈伤组织培养中,低浓度的稀土元素 Yb 和 Eu 有促进愈伤组织生长的作用^[4]。稀土元素镧在长春花细胞培养的前指数期加入对植物细胞的生长及次生代谢产物的积累都有促进作用^[5]。但有关稀土元素对 Ri 质粒转化根(毛状根)的作用未见报道。本实验以离体培养掌叶大黄毛状根为材料,研究不同浓度的稀土元素镧(La^{3+})对毛状根生长和蒽醌类化合物含量的影响。

1 材料与方法

1.1 稀土元素的配制及掌叶大黄转化根和非转化根的培养: La_2O_3 购自国家稀土研究中心,纯度大于 99.9%。取适量溶于 0.1 mol/L 稀盐酸中加热溶解,挥干盐酸,用去离子水定容后用于配制含稀土离子的液体培养基。

两种单克隆毛状根,编号分别为 DH5c 和 DH7a。两种毛状根以 0.5 g 的接种量分别接种于含不同浓度 La^{3+} 的 100 mL 液体培养基中。培养基为无机盐浓度均为 1/2 的无激素 WP 液体培养基。3% 的蔗糖作为碳源。每种毛状根和非转化根均设 3 组重复,置于转速为 100 r/min 的摇床上振荡培养,培养温度为 25 ℃。

1.2 掌叶大黄毛状根和非转化根生物量的测定:培养 40 d 后,收获 3 种掌叶大黄根培养物。先用镊子取出根,挤净根中所含培养基,用分析天平称重。用蒸馏水漂洗 1 min,80 ℃ 烘干,称重。

1.3 蒽醌化合物的 HPLC 检测

1.3.1 总蒽醌类化合物的提取:将称好干重的毛状根,用研钵研成粉末,分别装入 5 mL 试管中,每个试管中加入 2 mL 丙酮-甲醇(1:1)混合液,超声振荡 5 min 后置于 4 ℃ 冰箱中过夜。用注射器吸取每管中上清液,通过滤膜滤于 1.5 Eppendorf 管中,通风扇中挥干溶剂后准确加入 2 mL 甲醇,液相色谱测试。

1.3.2 对照品溶液配制:分别称取芦荟大黄素 2.5 mg、大黄酸 4.9 mg、大黄素 2.4 mg、大黄酚 4.1 mg、大黄素甲醚 2.9 mg,共同溶于丙酮-甲醇(1:1)的溶液中,定容于 25 mL 量瓶作为标准储备液,取 1 mL 该储备液定于 25 mL 量瓶作为测试对照品溶液。

1.3.3 HPLC 色谱条件:TSP P100 高效液相色谱仪,TSP UV100 紫外检测器,Phenomenex ODS-3 色谱柱,流动相为甲醇-1% 高氯酸(85:15),体积流量 1 mL/min,检测波长为 254 nm。

1.3.4 测定与分析:在上述色谱条件下,用 HPLC 测定各样品的峰面积,根据回归方程计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量。

1.4 统计分析:用 SPSS8.0 软件进行数据处理和统计分析。

2 结果

La^{3+} 对大黄根生物量及蒽醌产量积累的影响

2.1 La^{3+} 对大黄根生物量的影响:两种大黄单克隆毛状根和非转化根在附加有不同浓度 La^{3+} 的液体培养基中培养 40 d 后收获,称其鲜重,结果见表 1。

对其进行方差分析结果表明,在所使用的 La^{3+} 浓度范围内,3 种大黄根生物量的积累(鲜重)存在显著差异,此外,不同大黄根对鲜重的积累影响很大,它们之间存在显著的差异,进一步分析结果表明,DH7a 鲜重积累量最高,显著高于非转化根,但与 DH5c 差异不显著,结果见表 2。

La^{3+} 质量浓度在 0~1.0 mg/L 内,对大黄鲜重积累量影响不大,它们之间没有显著差异,但是,当

La³⁺ 提高到 10 mg/L 时,显著降低大黄根生物量的积累,说明高浓度的 La³⁺ 对大黄根生长有抑制作用。同一浓度下 3 种大黄根鲜重的平均值见表 3。

表 1 不同 La³⁺ 浓度对大黄根生物量的影响 (n=3)

Table 1 Effect of different concentration of La³⁺ on biomass of *R. palmatum* root (n=3)

La ³⁺ /(mg·L ⁻¹)	鲜重/g		
	DH5c	DH7a	NOR
10	9.28	9.03	5.76
1.0	12.34	14.56	8.50
0.1	11.17	16.11	8.34
0.05	12.76	14.21	12.79
0.01	12.61	15.02	8.66
0	11.79	15.87	7.77

表 2 不同大黄根鲜重比较分析

Table 2 Fresh weight comparison of two hairy clones of *R. palmatum* root

根	鲜重/g	显著水平	
		0.05	0.01
DH7a	14.14±2.61	a	A
DH5c	11.66±1.30	ab	AB
NOR	8.64±2.29	a	B

SD: 0.596

表 3 La³⁺ 浓度对大黄根鲜重比较分析

Table 3 Effect of La³⁺ different concentration on fresh weigh of *R. palmatum* root

La ³⁺ /(mg·L ⁻¹)	鲜重/g	显著水平	
		0.05	0.01
0.05	13.25	a	A
0.01	12.10	a	AB
0.10	11.87	a	AB
0.00	11.81	a	AB
1.00	11.80	a	AB
10.00	8.03	b	B

SD: 0.844

2.2 La³⁺ 对大黄根蒽醌积累量的影响:两种大黄单克隆毛状根和非转化根在附加有不同浓度 La³⁺ 的液体培养基中培养 40 d 后收获,提取总蒽醌类化合物,用 HPLC 测定 5 种蒽醌产量,结果见表 4。

方差分析结果表明,蒽醌种类、根的种类、La³⁺ 浓度与根种类之间的交互以及蒽醌种类与根种类之间的交互对蒽醌产量均有显著影响,而 La³⁺ 浓度与蒽醌种类之间的交互对蒽醌产量影响不大。

当培养基中 La³⁺ 质量浓度为 1.0 mg/L 时,蒽醌产量最高,显著高于 0.01、0.05、10、0 mg/L,以培养基中不含 La³⁺ 蒽醌产量最低,预示着适量的 La³⁺ 更有利于大黄根蒽醌产量的提高。同一浓度下 3 种大黄根蒽醌产量的平均值见表 5。

在含有 La³⁺ 的培养基中,蒽醌种类对蒽醌产量

表 4 不同 La³⁺ 浓度对大黄根中蒽醌产量的影响

Table 4 Effect of La³⁺ different concentration on anthraquinone yield in two hairy clones of *R. palmatum* plant

根类型	La ³⁺ /(mg·L ⁻¹)	蒽醌产量/(μg·瓶 ⁻¹)				
		芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
DH5c	10.0	6.25	1.48	3.49	2.83	4.00
	1.00	8.32	1.93	3.31	4.70	5.43
	0.10	7.53	2.10	3.01	4.26	4.73
	0.05	4.52	1.49	3.73	2.44	2.71
	0.01	2.69	0.82	4.71	1.56	2.08
	0.00	0.86	1.53	0.92	5.67	7.55
DH7a	10.00	6.82	7.30	1.65	2.72	2.08
	1.00	1.21	20.98	5.85	9.72	5.10
	0.10	7.47	15.83	5.07	10.52	4.29
	0.05	9.45	11.25	2.64	5.55	3.03
	0.01	8.82	17.11	2.30	5.48	2.84
	0.00	5.94	4.14	1.56	1.43	1.18
NOR	10.00	5.31	6.48	2.46	0.95	1.10
	1.00	9.53	14.00	5.81	8.56	5.20
	0.10	12.10	15.92	4.18	5.93	4.57
	0.05	2.87	4.41	3.15	3.80	3.08
	0.01	6.60	7.02	4.21	4.87	4.23
	0.00	7.96	9.25	1.24	0.97	2.24

表 5 La³⁺ 浓度对大黄根蒽醌产量影响比较分析

Table 5 Effect comparison of La³⁺ different concentration on anthraquinone yield of *R. palmatum* root

La ³⁺ /(mg·L ⁻¹)	蒽醌产量/(μg·瓶 ⁻¹)	显著水平	
		0.05	0.01
1.00	8.04	a	A
0.10	7.20	a	AB
0.01	5.00	b	ABC
0.05	4.30	b	BC
10.00	3.70	b	C
0.00	3.50	b	C

SD: 0.55

有显著影响,大黄酸、芦荟大黄素显著高于大黄酚、大黄素和大黄素甲醚,说明 La³⁺ 更有利于大黄酸和芦荟大黄素的积累。所有 La³⁺ 浓度下 3 种大黄根中各蒽醌产量的平均值见表 6。

3 讨论

在本实验浓度范围内,La³⁺ 对 3 种掌叶大黄根生物量积累有显著影响。La³⁺ 质量浓度提高到 10 mg/L 时,对大黄根生长表现出明显的抑制作用;La³⁺ 对 3 种掌叶大黄的蒽醌产量有极显著影响,当培养基中 La³⁺ 质量浓度为 1.0 mg/L 时,蒽醌产量最高;经稀土镧元素离子处理的 3 种大黄根中芦荟大黄素和大黄酸显著高于大黄素、大黄酚和大黄素甲醚。

稀土元素的作用效果与植物激素有相似之处,

表 6 蒽醌种类对蒽醌产量影响比较分析

Table 6 Effect comparison of different concentration on anthraquinone yield of *R. palmatum* root

蒽醌种类	蒽醌产量 ($\mu\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	显著水平	
		0.05	0.01
大黄酸	7.91	a	A
芦荟大黄素	6.95	a	AB
大黄酚	4.55	b	BC
大黄素	3.29	b	C
大黄素甲醚	3.63	b	C

SD: 0.50

有人认为,植物激素的促进作用与 Ca^{2+} -CaM 系统有密切关系,稀土具有类似钙的化学性质,被认为是超级钙 (supercalcium),低浓度稀土能激活依赖于 CaM 的各种酶的活性,高浓度抑制这些酶的活性。由此认为稀土的促进作用可能与 CaM 有关^[6]。稀土可能是同细胞膜外侧的受体结合,然后通过信号转导的途径,对植物的生长作出调控^[7]。

稀土对掌叶大黄毛状根生长表现的促进作用,其实质是影响体内的生理机制,提高了有关酶的含量和活力,进而提升了体内能量代谢和物质代谢水平。研究表明,稀土可以对植物体内生长激素的形成和激活起催化作用。因此,在大黄毛状根中也可能是通过促进生长激素(如赤霉素、细胞分裂素)的合成及运输,使之有足量的生长激素去解与 DNA

(基因)结合的组蛋白,释放出活动自由、具有表达功能的基因,从而促进 mRNA 的转录(合成)和酶蛋白的合成^[8]。

References:

[1] Hu Q H, Ye Z J. Physiological effects of rare-earth elements on plants [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 1996, 32 (4): 296-300.
 [2] Ni J Z. *Bioinorganic Chemistry on Rare Earth* (稀土生物无机化学) [M]. Beijing: Science Press, 1995.
 [3] Lu K K, Chang Z Z, Pei D Q, et al. Effect of rare-earth element on *Rhubarb* callus and anthraquinone level [J]. *J Northwest Pharm* (西北药学杂志), 1998, 13(5): 199-200.
 [4] Lu P, Guo H Z, Lu K K, et al. Effect of rare-earth elements on callus growth and alkaloid in *Coptis chinensis* [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1999, 34(3): 153-155.
 [5] Mei X G, Tian Z X, Wang C G, et al. Increased accumulation of taxol by some cellines of *Taxus* in response to addition of lanthanide [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12(5): 38-41.
 [6] Chang Z Z. Studies on *in vitro* culture and active constituents of Ri plasmid-transformed roots of *Rheum wittrochii* Lundser., *Rheum palmatum* L., *Cassia obtusifolia* L. [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Beijing Medical University* (北京医科大学博士学位论文) [D]. Beijing: Beijing Medical University, 1997.
 [7] Li W, Liang J S, Li Y R, et al. Studies on biological dosage effect of rare earth element on protein [J]. *Biotechnology* (生物技术), 2002, 12(1): 42-44.
 [8] Wang J Y. RE has some influence on safflower—seedling, part ferment and isozyme [J]. *Biotechnology* (生物技术), 2002, 12(2): 34-36.

不同产地丹参水溶性成分和脂溶性成分指纹图谱测定及相关性研究

金樟照, 祝 明, 张文婷, 戚雁飞

(浙江省药品检验所, 浙江 杭州 310004)

摘要:目的 分析不同产地丹参水溶性成分和脂溶性成分指纹图谱的变化情况,研究丹参脂溶性成分含量与水溶性成分含量之间的相关性。方法 采用 HPLC 法测定不同产地丹参水溶性成分、脂溶性成分的指纹图谱以及主要成分的含量,运用 SPSS 统计软件分析丹参成分变化情况。结果 丹参脂溶性成分和水溶性成分指纹图谱随产地不同而变化,丹参脂溶性成分含量与水溶性成分含量高低无内在关系。结论 建议制订丹参酚酸类成分含量,作为适用于丹参类注射液用的丹参药材标准,以区别于供复方丹参片等制剂用的丹参。

关键词:丹参; 丹参类注射液; 丹酚酸 B; 丹参酮 II_A; 指纹图谱

中图分类号: R282.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)10-1174-04

Studies on relationship between fingerprints of hydrophilic and hydrophobic components in *Salvia miltiorrhiza*

JIN Zhang-zhao, ZHU Ming, ZHANG Wen-ting, QI Yan-fei

(Zhejiang Institute for Drug Control, Hangzhou 310004, China)

Abstract: Object To study the different fingerprints of hydrophilic and hydrophobic components in

收稿日期: 2004-01-22

作者简介: 金樟照(1972—),男,浙江磐安人,主管药师,学士,主要从事中药质量标准研究。

Tel: (0571) 86459425 E-mail: jzz@zjyj.org.cn