

3.5 本研究为青叶胆的无性繁殖提供了一种方法,有助于短期内提供大量的试管苗,通过人工栽培扩大资源,确保青叶胆资源的保持和可持续利用。

References:

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Edita. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Tomus 62. Beijing: Science Press, 1988.
- [2] Tan W C, Dai C G. *The Tissue Culture Technic of Ornamental* (观赏植物组织培养技术) [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1991.
- [3] White P R. *Handbook of Plant Tissue Culture* [M]. New York: The Ronald Press, 1943.
- [4] van Nieuwkerk J P. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro* [J]. *Hort Sci*, 1986, 21(3): 516-518.
- [5] Yang Z D, Huang S X, Zhou C M, et al. Tissue culture and rapid propagation of medicinal plant *Stemona japonica* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(9): 843-846.
- [6] Huang H Y, Chen Y G. Tissue culture of medicinal plant *Swertia davidi* Franch. [J]. *Guihaia* (广西植物), 2002, 22(5): 433-436.
- [7] Huang H Y, Li L, Yang S H. Tissue culture of *Aloe vera* L. [J]. *J Jishou Univ—Nat Sci* (吉首大学学报·自然科学版), 2002, 21(3): 11-13.
- [8] Huang H Y, Li L, Yang S H. Tissue culture of *Gerbera jamesonii* Bolus [J]. *J Jishou Univ—Nat Sci* (吉首大学学报·自然科学版), 2001, 22(1): 4-6.

长春花叶片中吲哚生物碱增产的研究

张秀省^{1,3}, 张荣涛², 聂莉莉², 郭玉海¹, 翟志席¹

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; 2. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 3. 聊城大学农学院, 山东 聊城 252000)

摘要:目的 探讨乙烯利、乙酰水杨酸、色氨酸3种试剂对长春花植株中药用成分积累的影响。方法 用不同质量浓度的3种试剂溶液分别处理温室盆栽长春花植株, 2 d后, 测定叶片中的总吲哚生物碱含量, 并采用RP-HPLC法测定长春碱和长春质碱的含量。结果 3种试剂处理后吲哚总碱、长春碱、长春质碱的积累均有明显的提高, 并确定了最适的处理质量浓度。结论 3种试剂对长春花植物中吲哚生物碱的产生有明显的促进作用。

关键词: 长春花; 长春碱; 乙烯利; 乙酰水杨酸; 色氨酸

中图分类号: R282.13

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)02-0265-03

Enhancing accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* leaves

ZHANG Xiu-sheng^{1,3}, ZHANG Rong-tao², NIE Li-li², GUO Yu-hai¹, ZHAI Zhi-xi

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. College of Agronomy, Liaocheng University, Liaocheng 252000, China)

Abstract: Objective To study the effect of three kinds of reagent: ethrel, Aspirin, tryptophan on the accumulation of medicinal component in *Catharanthus roseus* leaves. **Methods** To treat these potplants of *C. roseus* in green house with the three reagents in different concentrations, respectively. Then, two days later, the contents of catharanthine and vinblastine in leaves were determined by RP-HPLC. **Results** The three reagents can obviously improve the accumulation of indole alkaloids, including catharanthine and vinblastine in *C. roseus* leaves. Their optimum treatment concentration was finally confirmed. **Conclusion** These three kinds of reagent apparently promote the accumulation of total indole alkaloids in the leaves of *C. roseus*.

Key words: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; vinblastine; ethrel; Aspirin; tryptophan

长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 是一种备受人们喜爱的观赏花卉, 也是一种人们熟悉的药材。中医临床可全株入药, 有利尿止血、镇定安神、

平肝降压等功效。20世纪50年代以来, 人们发现长春花的次生代谢产物对急性白血病、恶性淋巴瘤等具有很好的疗效^[1], 从而对其产生了浓厚的兴趣。

迄今为止,已经从长春花植物体中发现了多种具有生物活性的药用成分,它们大都是吲哚型生物碱。如结构为双吲哚型生物碱的长春碱(vinblastine)和长春新碱(vincristine)是目前临床上广泛应用的治疗多种肿瘤病的有效成分;而结构为单吲哚型生物碱的长春质碱具有抗菌利尿等治疗效果,阿玛碱可用于心血管病及高血压等。长春花被认为是一种具有很高开发应用价值的药用植物。

吲哚型生物碱是长春花次生代谢活动的产物,在植物体内含量很低。加之长春花生长受季节温度变化的限制,造成其原材料短缺。而利用化学合成的工艺又太过于复杂,成本过高,导致长春花药用成分的供需矛盾相当严重。长春碱每年只能生产 12 kg,而长春新碱每年只能生产 1 kg,远远满足不了需求。

为了更多地生产长春花生物碱,近些年来国内外不少学者尝试利用细胞培养技术来获取吲哚生物碱。但是,经试验证实,长春花细胞培养物没有合成双吲哚生物碱的能力。也就是说,利用细胞培养技术只能得到长春质碱和阿玛碱等一些单吲哚型生物碱,不能获得抗癌药物长春碱和长春新碱。因此,如何提高长春花植物体中吲哚生物碱的积累以得到更多目的产物的研究倍受国内外高度重视。

1 材料

1.1 长春花幼苗:温室盆栽苗,株高约为 10 cm,苗龄为 2 个月,生长健壮。盆土为肥沃的沙壤土。

1.2 长春花成苗:长春花苗龄 5 个月,株高 30~35 cm,顶端陆续开花,侧枝 5~6 个,正常肥水供应,生长健壮。

2 方法和结果

2.1 吲哚生物碱的测定:吲哚总碱的提取及含量测定,按文献方法^[2]。

2.2 长春碱和长春质碱的测定:按文献方法^[3,4]。

2.3 不同部位的长春花叶片中吲哚生物碱的分析:植物叶片是植物进行有机物合成与代谢的主要器官,大多情况下,叶片也是产生次生代谢产物的主要部位。为了了解实验条件下长春花次生代谢活动的的能力,本实验首先对温室盆栽生长健壮的长春花叶片中吲哚生物碱的含量进行了分析。分别取苗龄 5 个月的不同部位(上部、中部、下部)的叶片若干,混匀后,各取 3 份,每份 5 g,测定总吲哚生物碱,结果见图 1。长春花不同部位叶片中吲哚生物碱的含量有明显差异。上部含量较少,中部次之,下部含量较中部稍多些。剪取实验材料时,上部叶片幼嫩,叶片

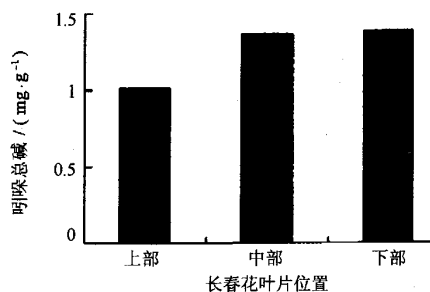
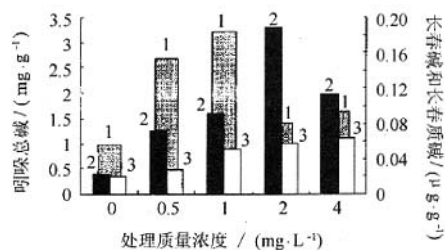


图 1 不同部位长春花叶中吲哚总碱的含量

Fig. 1 Total indole alkaloids in different parts of *C. roseus* leaves

较薄,叶龄约 20 d,还处于初生代谢的旺盛时期,生长快。中部叶片绿色较浓,叶龄约为 50 d。而此时下部叶片开始老化,已由绿色向黄色转化,叶龄约 90 d。可见,长春花次生代谢活力随叶龄的增长而上升,吲哚生物碱的含量也有所提高。

2.4 乙烯利对长春花叶片中吲哚生物碱积累的影响:用蒸馏水配制质量浓度为 0、0.5、1、2、4 g/L 乙烯利溶液,用喷雾器均匀地喷在苗龄 5 个月的长春花叶片上,对照及各浓度处理各 10 盆,2 d 后取中部叶片各 3 份,每份 5 g,测定吲哚总碱、长春质碱、长春碱的质量分数,结果见图 2。对图 2 的结果进行分析可知,不同质量浓度乙烯利对叶片中吲哚生物碱的积累均有明显的促进作用。但最适处理质量浓度差别较大。显著提高吲哚总碱的最适质量浓度是 1 g/L,约为对照组的 3 倍。而显著提高长春质碱的最适质量浓度为 2 g/L,约为对照的 3.5 倍。长春碱的含量在乙烯利的质量浓度为 4 g/L 时最高,为对照的 2 倍多。



1-吲哚总碱 2-长春质碱 3-长春碱
1-total indole alkaloids 2-catharanthine 3-vinblastine

图 2 乙烯利处理的叶片中吲哚生物碱

Fig. 2 Indole alkaloids in *C. roseus* leaves treated by ethephon

2.5 乙酰水杨酸对长春花叶片中吲哚生物碱积累的影响:用蒸馏水配制成 0、0.5、1、2、4 mg/L 乙酰水杨酸溶液,用喷雾器均匀地喷在苗龄 5 个月的长春花叶片上,对照及各质量浓度处理各 10 盆,2 d

后取中部叶片各 3 份, 每份 5 g, 测定总吲哚生物碱、长春质碱、长春碱的质量分数, 结果见图 3。从图 3 可以知道, 乙酰水杨酸处理对长春质碱的质量分数影响最大, 质量浓度为 2 mg/L 时, 长春质碱的质量分数约为对照的 5.6 倍; 总吲哚生物碱次之, 为对照的 2 倍多; 长春碱质量分数约为对照的 1.7 倍。

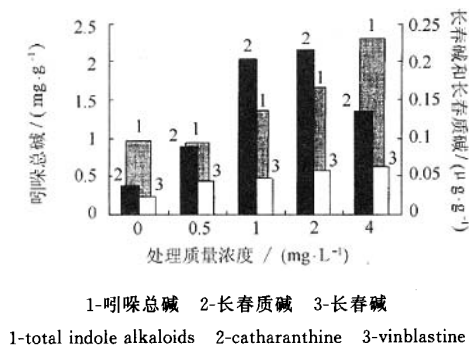


图 3 乙酰水杨酸处理的长春花叶片中吲哚生物碱质量分数

Fig. 3 Indole alkaloids in *C. roseus* leaves

treated by Aspirin

2.6 色氨酸前体饲喂对长春花幼苗吲哚生物碱积累的影响: 长春花吲哚生物碱合成的前体物质是色氨酸, 在植物体内吲哚类化合物的质量分数与色氨酸的代谢密切相关。本实验用不同质量浓度的色氨酸溶液处理盆栽苗龄 2 个月的长春花幼苗, 以期筛选出影响长春花药用成分积累的最适质量浓度。用蒸馏水配制质量浓度为 0、500、1 000、1 500、2 000 mg/L 色氨酸溶液, 缓慢地浇施在盆中, 2 d 后剪取叶片, 各处理称取叶片 3 份, 每份 5 g, 进行吲哚生物碱测定, 见图 4。实验结果表明, 色氨酸可促进长春花幼苗叶片中吲哚生物碱的积累, 无论是总吲哚生物碱还是长春质碱和长春碱都有一定程度的提高, 其中总吲哚生物碱提高了约 1.5 倍, 长春质碱提高了约 3 倍, 长春碱提高了约 1 倍。促进总吲哚生物碱、长春质碱、长春碱积累的最适色氨酸质量浓度分别是 1 500、1 500、1 000 mg/L。

3 讨论

乙烯利、乙酰水杨酸和色氨酸溶液对长春花叶中总吲哚生物碱、长春碱、长春质碱的积累都有促进作用。处理浓度适宜、效果更佳。它们对长春质碱的影响尤为明显, 最高是对照的 5.6 倍。本实验结果初

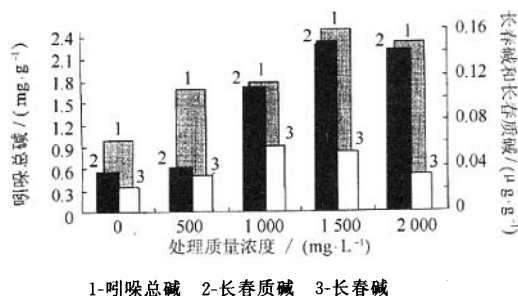


图 4 色氨酸处理的长春花幼苗叶片中吲哚生物碱

Fig. 4 Indole alkaloids in young *C. roseus*

leaves treated by tryptophan

步证明, 在生产实践中, 利用以上 3 种试剂处理, 可达到使长春花药用成分增产的目的。还应提及的是, 长春质碱除本身具有生物活性外, 它还是合成双吲哚生物碱的原料。植物体具有将单吲哚生物碱长春质碱和文多灵合成双吲哚生物碱的能力, 但因为酶催化活性较差, 双吲哚生物碱产生很少。近些年来, Ketney^[5]等用化学方法将长春质碱和文多灵成功合成了长春碱和长春新碱, 无疑为获取抗癌药物开辟了一条很有希望的途径。所以设计各种方法提高吲哚生物碱积累的研究工作具有理论意义, 更有应用价值。

References:

- [1] Chen M, Liao Z H, Sun M, *et al.* Application of biotechnology in studies of *Catharanthus roseus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(1): 78-81.
- [2] Wang N N, Wang S F, Tian J Y, *et al.* Study on cell suspension culture of *Catharanthus roseus* crown gall cell induced by *Agrobacterium* C₅₈ [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 1994, 10(3): 244-249.
- [3] Zhang X F, Zhang R T, Wang N N, *et al.* Effects of fungal elicitors on accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* calli [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(2): 201-204.
- [4] Zhang X F, Zhang X X, Wang Y, *et al.* Effects of plant growth regulators on the accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* calli [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2004, 40(3): 303-304.
- [5] Ketney J P, Boulet C A. Alkaloids production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell cultures. Synthesis of bisindole alkaloids by use of immobilized enzyme systems [J]. *Heterocycle*, 1988, 27: 621-628.