

药用植物生物工程研究进展 I. 组织和细胞培养研究

黄璐琳, 胡尚钦, 杨 晓

(四川省农科院中药材研究中心, 四川 简阳 641400)

摘要:药用植物生物工程——组织和细胞培养在濒危物种保护、重要资源恢复、退化种质脱毒改良和次生代谢物生产等领域应用前景广阔。分别从药用植物组织培养的外植体、培养基和培养条件、诱导子、抗性、产物药效成分、脱毒培养等方面和细胞培养的培养基和培养条件、高产细胞系的筛选、诱导子、产物药效成分、生物反应器、固定化培养等方面进行了总结研究。

关键词:药用植物; 生物工程; 组织培养; 细胞培养

中图分类号: R282-1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)04-0486-06

Advances in studies on bioengineering in medicinal plants I. Tissue and cell culture

HUANG Lu-lin, HU Shang-qin, YANG Xiao

(Research Center of Chinese Medicinal Materials, Academy of Agricultural Sciences
of Sichuan Province, Jianyang 641400, China)

Key words: medicinal plant; bioengineering; tissue culture; cell culture

White 和 Gautheret 在 1939 年建立了植物组织无菌培养技术, 开启了生物工程的大门, 目前已成为 21 世纪研究的热点和焦点。我国蕴涵了丰富的药用植物资源。组织培养和细胞培养是药用植物生物工程的主要内容, 还是基因工程的基础和前提。本文对药用植物的组织和细胞培养的相关研究状况进行了综述, 以期对相关研究提供参考。

1 组织培养

植物组织培养(plant tissue culture)是指在无菌的条件下, 将离体的植物(根、茎、叶、花、果实、种子等)、组织(形成层、药花组织、胚乳、皮层等)以及原生质体, 培养在人工配制的培养基上, 给予适当的培养条件, 使其长成完整的植株。由于培养物是脱离植物母体, 在玻璃瓶中进行培养, 所以也叫做离体培养。目前进行组织培养的药材种类繁多, 是生物技术在药用植物上研究得最多的一个传统领域。组织培养在濒危药用物种保护、珍稀名贵药用植物的快速繁殖、新品系的扩大繁殖、常用大宗药用植物的细胞脱毒等方面应用广泛。我国已经开始组织培养和快速繁殖研究的药用植物有人参属植物(人参、西洋参、三七、竹节参、珠子参)^[1]、半夏、甘草、黄山药、石斛属植物(曲茎石斛、霍山石斛)、灯盏细辛、喜树、药菊花、粉花绣线菊、鱼腥草、山茱萸、罗汉果、芦荟、地

黄、白头翁、贯叶金丝桃、连翘、山豆根、肉苁蓉、浓蜜贝母、土茯苓、丹参、百合、黄芩、天麻、百部、紫草、青蒿、乌头、南方红豆杉、山药、川贝母、雪莲花、太子参、冬虫夏草、何首乌、盾叶薯蓣、浙贝母、长春花、绞股蓝、银杏以及台湾地区台湾大学药学系进行研究的山本草乌、知母、石斛类药材、竹叶柴胡、双锯齿叶玄参等 100 余种名贵、珍稀、濒危、常用品种^[2]。通过组织培养, 还可生产人工种子^[3]。

1.1 外植体: 用于进行组织培养的材料称为外植体。根据不同的药用植物, 用于诱导培养的外植体不尽相同。常用的组织和器官有无菌实生菌、根、须根、茎、块茎、鳞茎、球茎、芽、子叶、吉片、叶柄、鳞片、花蕾、花序、花芽、花瓣、花药、花丝、子房、果肉、果实、原生质体、珠芽等植物体的各个部位, 其中最常用的有鳞茎、顶芽、茎尖、腋芽、叶、花茎、花蕾^[2]等, 相关研究很多。涂红艳等对细茎石斛的组织培养研究, 表明细茎石斛种子在 MS 不含激素的培养基上有较高的萌发率, 种子萌发后形成的原球茎保持阶段十分短暂, 极易分化, 2 个月后形成小苗。外植体类型对拟原球茎的诱导有较大的影响, 成熟茎段很难脱分化, 幼嫩组织的诱导率相对较高, 但幼芽段褐化较高, 适宜做外植体是丛生幼芽。姜维梅等研究抗癌药用植物猫人参以茎段(至少带一个节)、叶片外植体

收稿日期: 2005-06-12

作者简介: 黄璐琳(1978—), 女, 四川简阳人, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学, 主要从事中药材 GAP 及分子生物学相关研究。 Tel: (0832)7013346, (023)68139517 E-mail: huangluling@163.com

离体培养,表面以茎段作为外植体效果较好,容易消毒,能很快诱导腋芽萌发;以叶片作为外植体,成功诱导出愈伤组织,但此愈伤组织的分化能力极低。胡益明等研究药用植物粉花绣线菊的组织培养,表明幼叶、茎尖、叶柄等外植体均能诱导出愈伤组织,其中以茎尖外植体诱导的效果最好。贝丽霞等研究了刺五加组织培养,选用刺五加的叶片、茎尖、当年生根为材料,表明来源于叶片的愈伤组织的分化能力最强。雒晓芳对当归的组织培养表明,各种外植体的诱导效果依次为叶柄、根尖、叶片。

1.2 培养基及培养条件:培养基是外植体生长的营养基础,常用的培养基有 MS、B₅、White、Heller、ER、Nitsch、NT 等,最常用的是 MS 培养基,激素(生长素和细胞分裂素)使用范围一般在 0.5~30 mg/L^[2]。诱导外植体的生长与分化和促进中间体增殖的培养基一般只具有较小的差别,诱导壮苗与生根培养基用量减轻。不同植物所使用的培养基有所差别,氮源、碳源和激素对培养影响显著。光照、温度、气体状况、季节、pH 等因素对培养有较大的影响。李明芳等研究激素对盾叶薯蓣愈伤组织细胞生长和薯蓣皂苷元合成的调控表明,不同生长素对盾叶薯蓣愈伤组织细胞生长量的影响差异大小为 NAA>IAA>2,4-D,而对薯蓣皂苷元合成的影响是 2,4-D>IAA>NAA。在有生长素存在的条件下,光照 24 h,另加 0.5 mg/L KT 可促进愈伤组织细胞的生长,而附加 0.5 mg/L BA 可促进薯蓣皂苷元的合成;相反,光照 12 h,另加 0.5 mg/L BA 促进愈伤组织细胞生长,附加 0.5 mg/L KT 促进薯蓣皂苷元合成,愈伤组织生长越旺,薯蓣皂苷元积累越少^[4]。盛长忠等进行了 pH 对红豆杉愈伤组织生长、苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性和紫杉醇量的影响研究,表明不同红豆杉愈伤组织所需最适 pH 值不同,而有利于愈伤组织生长的 pH 值均不利于 PAL 活性的提高和紫杉醇的积累,pH 值明显影响红豆杉愈伤组织的生长及次级代谢水平,从而影响了紫杉醇的合成与积累^[5]。陈书安等对藏红花研究表明,MS 是藏红花芽愈伤组织的最佳诱导培养基,而 B5 是叶子和花愈伤组织的最佳培养基,藏红花芽、叶和花愈伤组织的最佳诱导温度分别是 18、25 和 21℃,光照是叶子愈伤组织诱导的有利因素,但不利于芽和花愈伤组织的诱导,1.5~2.0 mg/L NAA 和 0.25 mg/L 6-BA 是愈伤组织诱导的最佳激素组合^[6]。涂红艳等对细茎石斛的组织培养研究,表明激素 TDZ 对拟原球茎的诱导有明显的促进作用,但 TDZ 会导

致苗矮化,茎细,根短而少;MS+BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+TDZ 0.1 mg/L 组合的培养基拟原球茎诱导率最高,拟原球茎的增殖以 1/2 MS+NAA 1 mg/L+3%蔗糖为佳,且拟原球茎的生长需要一定的光照,高浓度的 BA 和低浓度的 NAA 组合,可加快拟原球茎的分化进程,拟原球茎分化形成小苗后,在幼苗壮苗过程中,BA 和 NAA 有不同的作用,BA 会促进植株的分蘖,而 NAA 利于植株生长,但浓度过高会抑制苗生长,因此壮苗期间用低浓度的 NAA 和 IBA 组合效果更好。

1.3 抗逆性:组培苗的抗逆性研究是药用植物组织培养的一个方面,目前已经有相关的研究报告,如陈华等进行了蒲公英的耐盐性研究,陈玉珍等进行了母雪莲愈伤组织的抗冻性研究。李冬杰等进行了红豆杉细胞培养过程中抗褐变剂的总结研究^[7]。

1.4 药效成分:为了明确组培药用植物的质量,需将药效成分与普通植物进行比较研究以确定组培药材质量,有应用价值和组培植株获得的有效成分通常不低于普通植物。研究表明,中华芦荟组培苗与正常苗的水溶性多糖量相当。王跃华等对川黄柏的离体培养物的药效成分抑菌试验表明,培养物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌具有良好的抑菌效果^[8]。孙瑞强等利用 FTIR 和 HPLC 法对栽培藏红花和组培藏红花的药用成分进行比较研究表明,组培藏红花的代谢产物种类较少,主要成分种类与栽培的相同,但是具有抗癌活性的藏红花素 A(crocin A)的量高于栽培藏红花 2~3 倍^[9]。谢德玉等通过愈伤组织培养获得的青蒿植株青蒿素可达到 0.92%(干重),较栽培植株(0.52%)高^[10]。赵沛基等研究青阳参嫩枝和芽诱导的愈伤组织表明,在 33 d 时次生代谢产物的量最高,并从中分离到 7 个化合物,首次报道从植物愈伤组织中分离到多羟基十八碳烯酸^[11]。赵琳等研究了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表明,盐生肉苁蓉培养细胞中所含成分种类较多,且大部分量较高,其中洋丁香酚苷(类叶升麻苷)和松果菊苷的量明显高于肉苁蓉药材。

1.5 培养脱毒苗:脱毒苗是指除去病毒的组培苗。脱毒苗具有无杂菌、适应能力较强、繁育较快、质量优、抗性好、分蘖性强、繁殖系数高、大批量生产、周年供应、便于运输等优点。植物脱除平凡毒有热处理、茎类培养和抗病毒药剂 3 种方法。茎尖脱毒往往采用 0.1~0.3 mm 的茎尖。热处理(38.5℃培养 1 周)可以让 2 mm 的罗汉果茎尖脱毒率达到 100%。李明军等对怀地黄、怀山药进行了组培脱毒

研究表明,脱毒产量提高 30% 以上。冯英等总结研究表明,生姜脱毒苗田间不受病菌和线虫感染,其他指标与栽培者相同^[12]。徐品三等研究了百合不定芽培养脱毒种球生产,表明百合不定芽培养再生植株的病毒脱毒效果因百合品种和病毒种类而有所差异,卡萨布兰卡百合晨病毒(LSV)容易脱去,脱毒率达 76%;魅丽黄瓜花叶病毒(CMV)能全部脱去^[13]。

1.6 人工种子:人工种子是指把植物组织培养出来的胚体或芽孢在含有营养物质并具有保护功能的凝胶胶囊中,使其保持种子的机能直接用于播种,在适宜的条件下能与自然种子一样发芽出苗。张铭等应用黏土和蛭石粉作基质包埋铁皮石斛种胚来制作人工种子表明,当黏土-蛭石粉-MS 培养液为 2:1:2 时萌发率可达 56.8%。在此系统中单独添加 1.0% 活性炭或同时添加 1.0% 活性炭和 0.5% 淀粉制作的铁皮石斛人工种子,平均萌发率分别达 76.7% 和 80.3%,分别比对照提高了 18.4% 和 24.2%,还研究了壳聚糖等作为外种皮以及原球茎的失水率对铁皮石斛人工种子萌发及贮藏的影响。郭顺星等以原球茎为材料,建立了铁皮石斛人工种子的初步制作流程,以改良 1/2 MS 培养基各种成分附加蔗糖为人工胚乳的人工种子存活率、发芽率、成苗最好,其发芽率可达 80% 以上。朱长甫等用 4% 海藻酸钠包埋直径 2~3 mm 的半夏小块茎制成的人工种子,在无菌培养基上的萌发率可达 70%,在未灭菌泥炭土中约为 30%,人工种皮内添加适当激素可促进萌发,而添加的营养物质作用不大,适当脱水有利于人工种子贮藏。

2 细胞培养

细胞培养是生物技术领域里的一个重要分支,通过药用植物的细胞培养,产生重要的次生代谢产物以及进行生理生化和遗传学研究,大部分传统药材的有效成分是次生代谢产物,采用大规模细胞培养是解决濒危药用植物及药效成分低的药用植物满足用药需求的重要途径,细胞培养具有生长速度快、周期短、产物均一可控、药效成分高于天然植物等优点。目前已经建立细胞体系的有人参(生产人参皂苷)、西洋参(人参皂苷)、长春花(长春花碱)、红豆杉(紫杉醇)、三七(三七皂苷)、水母雪莲(藏药,黄酮类,抗风湿)、青蒿(青蒿素)、紫草(紫草宁)等^[10]。已经从 400 多种植物中建立了组织和细胞培养物,从中分离出 600 多种代谢产物,其中 40 多种化合物在数量上超过或等于原植物,通过筛选高产细胞系,改进培养条件和技术,以及设计适合植物培养细胞的

发酵罐,为工业化生产代谢产物奠定了基础。

2.1 培养路径:细胞培养的路径为待培养愈伤组织的诱导和培养→单细胞分离→优良细胞株的建立→扩大培养→发酵罐发酵。

2.2 培养基和培养条件:通常采用液体培养,常用的培养基和激素与组织培养相似,常用的培养基有 MS、B₅、White、Heller、ER、Nitsch、NT 等。液态 MS 培养基仍然是最常用的培养基,激素(生长素和细胞分裂素)使用范围一般在 0.5~30 mg/L。不同的植物细胞所要求的能源、矿物质和激素有较大的差别,碳源、磷源、氮源的数量和种类对培养效果影响显著,需经过筛选确定较佳培养基。胡萍等进行了南方红豆杉悬浮培养过程中碳、氮、磷的补加对细胞生长影响的研究,表明碳源在悬培养中期消耗殆尽,后期碳源的缺乏限制了细胞的生长,补加碳源组与对照组相比,细胞生长率和细胞密度明显提高,其中细胞生长率约提高了 83%^[3]。许名淑等对贯叶金丝桃的细胞培养研究表明,硝态氮和铵态氮的比例为 1:3 时,愈伤组织生长量提高 1.6 倍,金丝桃素的合成量也略有增另,加入甘露 0.1~0.2 mol/L 时金丝桃素的合成大大提高,加入 PVPP、PVP 等防止褐化的物质能促进愈伤组织的生长^[14]。赵德修研究了 8 种不同基本培养基对水母雪莲细胞生长和黄酮形成的影响,MS 培养基较有利于细胞生长和黄酮形成;对细胞培养物中 2 种黄酮(jaceosidin 和 hispidulin)定性定量分析表明,从 MS 培养基修饰得到的 MG 和 MP 培养基比 MS 培养基细胞生长量与黄酮产量分别提高了 32% 和 70%;碳源、氮源、植物激素对细胞生长及黄酮形成的影响较为明显^[15]。成喜雨研究表明肉苁蓉的细胞培养在添加了 NAA 1.0 mg/L, 6-BA 2.0 mg/L, 2,4-D 0.25 mg/L 和蔗糖 30 g/L 和 56.9 mg/L;悬浮培养条件下干重和苯乙醇 PeGs 产量在 21 d 达到最大,分别为 8.1 g/L 和 97.3 mg/L,细胞悬浮培养的第 0~3 d 为延滞期,3~18 d 为对数生长期,18~30 d 为平衡期和衰亡期。王红强等研究了中国红豆杉悬浮细胞高密度培养,采用 30 g/L 起始糖浓度,通过在细胞对数生长后期补料的方法成功地在 250 mL 摇瓶和 1.5 L 搅拌式生物反应器中进行了细胞高密度培养,经 20 d 培养,细胞干重超过 25 g/L。在反应器培养中,次生代谢产物紫杉烷的产量较低,通过高密度培养,明显增加了细胞量,还可以提高反应器中紫杉烷的产量。赵凯等采用正交试验法,研究了醋酸钠、苯丙氨酸、酪氨酸、高氨酸对 HQD33(紫杉醇产生菌)产生紫杉醇的影响,

表明它们之间的协同作用对提高紫杉醇产量有显著影响。在改良的 S-7 培养基基础上,再加入醋酸钠 10 g/L、苯丙氨酸 50 mg/L、酪氨酸 15 mg/L、亮氨酸 60 mg/L,可以使 HQD33 产生紫杉醇提高到 204 mg/L。张亚妮等研究了 T14(紫杉醇产生菌)产生紫杉醇的最适温度为 30 ℃,最佳 pH 为 5.5,最适碳源为蔗糖,最适氮源为 0.3% 的氯化铵;间歇补加蔗糖有助于菌体的快速生长和紫杉醇的提高;在培养基中添加 Mg_2SO_4 、 $MnCl_2$ 、 KH_2PO_4 等微量元素,却完全抑制了紫杉醇的产生。陈玉珍等进行了水母雪莲愈伤组织和悬浮培养细胞的抗冻性研究,表明水母雪莲愈伤组织和悬浮培养细胞可分别抵抗 -6.5 和 -7.5 ℃ 的冰冻低温胁迫,愈伤组织细胞内丰富的蛋白质和淀粉粒多糖是构成较强抗冻能力的物质基础,低温锻炼后,细胞内有新的多肽合成,悬细胞抗冻能力的提高和蛋白质合成的增强是一致的^[16]。

2.3 细胞株筛选:制约一个天然产物实现产业化的因素主要是工程因素和细胞株,高产细胞株的筛选是细胞培养的关键技术之一。曹有龙等进行了枸杞原生质体培养及高效成析体系建立的研究,将悬浮培养细胞游离的原生质体在改良的 MT 培养基上浅层培养,3~4 周后形成块状愈伤组织细胞团,植板率为 1.25%,将细胞团转移到改良的 MS 液体培养基,8~10 d 可形成大量胚状体,转移到改良的 MS 固体培养基上,可形成大量绿芽,分化率 54.17%^[17]。陈书安等进行了藏红花红色素(crocin)细胞系的筛选研究,通过目视法和 HPLC 法,从 229 株细胞系中筛选出细胞系 Corm1,其中含藏红花素 1 1 677 $\mu\text{g/g}$,生长较快,且不易褐化,为采用植物细胞工程法解决藏红花素 1 资源短缺问题打下了基础。戴均贵等利用单细胞克隆方法,获得 48 个 G-22 株系银杏内酯 B(GKB),质量分数高达 0.099%,大部分克隆株系在继代培养中能保持稳定,在一定程度上可解决银杏内酯生产不稳定的问题^[18]。赵凯等对紫杉醇产生菌原生质体诱变的酶系组成、pH 值、酶解温度和酶解时间等影响树状多节孢原生质体制备与再生和原生质体诱变研究表明,在 30 W 紫外灯、距离 30 cm、照射 50 s;UV+0.6% LiCl 复合诱变、照射时间 40 s 的最佳条件下,诱变菌株经初筛和复筛,选出了 2 株高产紫杉醇的原生质体诱变菌株——UV40-19 和 UL50-6,其产量从出发菌株紫杉醇的产量(314.07 $\mu\text{g/L}$)分别提高至 376.38 和 392.63 $\mu\text{g/L}$ ^[19]。严海燕对紫草组织培养中细胞发育时期与紫草宁形成关系的研究表明,营养生长阶段细胞发育时期和生理生化状态与色素合成能力密切相

关,细胞分裂高峰期以后,细胞合成紫草宁的能力开始增加,细胞营养生长静止期色素合成能力达到饱和,色素形成时期色素合成曲线同细胞生长曲线一样呈 S 型。因此,细胞首先满足自身基础的生命活动,在此基础上才能积累中间或次生代谢物^[20]。

2.4 诱导子:诱导子狭义上是指能够与细胞发生相互作用,通过细胞内一系列的信号传导过程,作用于与细胞次生代谢相关的基因表达,进而改变细胞次生代谢相关酶活力,最终使细胞次生代谢水平发生改变的物质,可引起次生代谢途径通量和反应速率的改变,从而提高次生代谢产物的产量,按照其来源可分为生物诱导子(来源于生物)和非生物诱导子(非生物提供)。广义诱导子是指所有能够提高细胞次生代谢相关酶活力,进而提高细胞次生代谢水平的外界因素,包括各种物理因素。

2.4.1 非生物诱导子:主要有稀土元素、水杨酸和茉莉酮酸类物质。袁小凡等总结了稀土元素对细胞培养的影响,表明稀土元素对植物细胞、组织生长和次生代谢产物的合成都有重要作用,其作用机制可能是作为生物活性金属的调节剂,可影响植物细胞的超微结构,对植物细胞增殖及相关酶系有影响,对活性氧的清除和对细胞膜渗透性产生影响,从而达到了促进组织生长和促进次生代谢物的生物合成。稀土元素镧、铈能促进紫杉醇的合成,能替代某些酶的钙、镁离子,激活的活性,促进酶基因转录,从而促进紫杉醇的合成。

胡萍等研究添加诱导子和紫杉醇合成前体物对红豆杉细胞的生长和脱氢酶活力的影响表明:水杨酸对细胞生长有一定的毒性;甲基茉莉酮酸对细胞的毒性较小,并使细胞的生长期延长;低浓度的苯丙氨酸使细胞生物量和脱氢酶活力略有提高,苯甲酸钠对细胞生长有一定的抑制作用,但在较低浓度下对细胞生长影响不大^[21]。Pauli 等研究证实茉莉酮酸类物质可通过诱导细胞色素基因 P450 的表达,从而诱导细胞色素 P450 酶的活性来促进植物次生代谢物质的生物合成。苗志齐等发现水杨酸、花生四烯酸可促进紫杉醇合成大大提高,推测其作用途径是通过抑制细胞过氧化物酶的活性使植物体内 H_2O_2 水平上升,从而诱导或加强抗病反应,激活抗病途径中的相关防御基因,致使紫杉醇的大量合成。王艳东等研究甲基茉莉酮酸对悬浮培养南方红豆杉细胞代谢的影响表明,其可促进细胞由初生代谢提前向次生代谢转化,还能够增强细胞的次生代谢,有利于细胞相关次生代谢产物的合成^[22]。

2.4.2 生物诱导子:主要有真菌类物质和微生物酶。李家儒等用真菌结青霉菌菌丝体提取物 20 mg/L 诱导紫杉醇效果最好。张平等发现尖孢镰刀菌细胞壁粗提物使紫杉醇较对照提高 5 倍左右。利用发根农杆菌 Ri 的质粒浸染培养物组织,产生转基因毛状根,毛状根中富含次生代谢产物,可以此获得次生代谢产物,是研究的一个重要方面。人参毛状根具有可在无激素的培养基上生长,拥有亲本植物的次生代谢途径、遗传稳定、生长迅速等特点^[1]。刘俊等研究了真菌诱导子对人参毛状根皂苷生物合成和生长的影响,表明可促进皂苷的生物合成^[23]。杨世海等研究发现黑曲霉诱导子对发根农杆菌 LBA 9402 感染的决明毛状根中蒽醌类化合物有明显的促进作用,其中 10 μ mol/L 作用最强,蒽醌类化合物总量较对照提高 73%^[24]。成喜雨对肉苁蓉的细胞培养研究表明酵母诱导子的添加同时促进了细胞生长和 PeGs 合成,在培养第 15、17、19 天以总糖 106 mg/L 的质量浓度 3 次加入酵母诱导子极大地刺激了 PeGs 的合成,其质量分数和产量在 21 d 分别达 31.3 mg/g 干重和 317.8 mg/L 为对照培养的 195% 和 235%。壳聚糖诱导子对细胞的生长有一定抑制作用,但体现了更好的诱导效果,在培养第 15 和 17 天以 10 mg/L 的质量浓度 2 次加入壳聚糖诱导子极大地刺激了 PeGs 的合成。张向飞等进行了真菌诱导子对长春花愈伤组织中吲哚生物碱的影响研究,表明由镰刀菌和黑曲霉的菌体匀浆物上清液制备而来的 2 种诱导子影响显著。

由病原菌分泌出来的果胶多糖降解酶能作为诱导子诱导植保素的积累,这种诱导子能使植物细胞壁释放出一种内生诱导子,与部分酸水解法获得的诱导子类似,是植物重要的次生防御机制,虽然目前的报道很少,但从得到的一些结果来看有良好的应用前景。周立刚等进行了溶菌酶对三七细胞悬浮培养影响的研究。结果显示 5、10、15 d 加入溶菌酶,细胞培养物产率和皂苷产率均得到提高;诱导期为 10 d 时,溶菌酶能明显地促进皂苷合成,皂苷产率比对照提高了 63.48%。溶菌酶除了有促进皂苷合成和细胞生长的作用外,还可防止污染的发生。

2.4.3 添加合成前体:添加合成前体有利于次生代谢产物的早期积累或转化。唐建军等研究表明添加合成胶体可促进离体培养条件下次生代谢物积累,提高目的产物量。叶敏等在桔梗悬浮培养体系中加入斑蝥素并培养 6 d,培养液经萃取后采用色谱方法进行分离纯化,得到了以 2:1 比例混合存在的 2 个

转化产物,是一对差向异构体 1 β -羟基斑蝥素(Ia)及 1 α -羟基斑蝥素(IIb),均为未见报道的新化合物,此转化反应可用于斑蝥素衍生物的制备^[25]。张亚妮等研究表明添加苯丙氨酸对紫杉醇的提高有明显地促进作用,而由苯丙氨酸、乙酸铵和酪氨酸组成的混合前体的作用则更为明显,紫杉醇产量达到 352.64 μ g/L。

2.5 药效成分:药效成分与栽培植株的比较研究也是细胞培养的重要方面,通常培养物量应高于栽培植物才具有开发价值。罗建平研究了霍山石斛原球茎在液体培养中增殖、水溶性多糖和总生物碱积累特征,水溶性多糖和总生物碱量分别为 3.57% 和 0.026%,生物碱量与栽培苗相当,多糖量大大提高^[26]。以培养药效成分为目的的细胞工程也已经取得了进步。李晨东等综述了利用细胞和基因工程在获得药用植物有效成分中的研究进展^[27];邢建民等综述了利用植物细胞培养方法合成黄酮类化合物的研究状况和各种环境条件对植物细胞生长和黄酮类化合物合成的影响^[28]。贾廷耀等进行了伊贝母组织培养中次生代谢产物的研究,表明组织培养物含有贝母碱的主要成分西贝素,但根中贝母碱的成分要比其他组织或器官中更为复杂,量和活性也较高,继代培养 8 代的不定芽和不定根中贝母碱的量分别高于栽培 5 年贝母根的 0.01% 和 0.02%。张长河等在两步法红豆杉细胞悬浮培养体系的生产阶段,加入从生长阶段悬浮培养物中制得的条件培养液(conditioned medium, CM),能促进细胞的生长,提高紫杉醇的产率,取自生长 12 d 的细胞悬浮培养物的 CM 按体积分数为 25% 添加到新鲜生产培养基中时,可使细胞紫杉醇最高产量达 28.5 mg/L,细胞干重达 32.2 g/L,分别是对照的 2.4 倍和 2.2 倍。

2.6 生物反应器:植物细胞的反应器培养是实现工业化生产的前提,生物反应器是使生物反应得以实现的装置,生物反应器在植物细胞培养方面具有条件可控和可放大的特点,使用普遍。陈巍等研究表明,人参细胞的工业化大规模培养早在 20 世纪 80 年代已在日本实现,人参不定根的大规模培养也于近年在韩国投产。人参属植物常用的反应器有机械搅拌式和空气提升式 2 种,分氧压 21.3~29.3 kPa 是人参属植物培养较佳的范围。Zhong 等研究表明,一种新型的搅拌反应器离心叶轮式生物反应器已用于三七细胞的高密度培养,细胞产量和皂苷产量明显提高。反应器中常用的培养基主要为改良的 MS 液体培养基,pH 一般在 5.8 左右^[1]。在培养鸡眼藤

细胞以产生蒽醌的过程中,4种反应器,即平叶轮式、圆盘状叶轮搅拌式、Kaplan内循环气升式、普通内循环气升式,蒽醌产量与产率在气升式反应器中最高。毛地黄及彩叶紫苏细胞培养研究表明,气升式反应器利于次生代谢产物的转化,而搅拌式反应器利于生物量的积累。紫草细胞培养生产紫草宁使用了搅拌式生物反应器,用200 L的生物反应器进行细胞增殖,然后转接到750 L的生物反应器上进行紫草宁的合成,不同搅拌器的搅拌式生物反应器和气生式生物反应器对金花小檗细胞合成原小檗碱产量相当。带有螺旋形搅拌器40 L反应器培养毛地黄细胞时,9 d周期从15 g地高辛中得到了13 g乙酰毛地黄苷。使用装有垂直带搅拌器的搅拌式生物反应器培养长春花细胞时,培养液细胞浓度(干重)达到25~27 g/L。使用3 L搅拌式生物反应器培养苦楝树细胞生产苦木素显示,植物细胞经过几年的驯化,对剪切的耐受能力大大提高。鼓风式反应器已用于长春花和紫草的培养,长春花细胞培养液通气速率从0.25 L/(L·min)上升至0.38 L/(L·min)时,其相对速率反而从0.34 d⁻¹上升至0.41 d⁻¹,在7 L的气升式反应器中培养,流速大于0.3 L/(L·min)时,速率有所减慢,通气中混合2.4%的CO₂能够消除高通气速率对长春花细胞生长和次生代谢产物产率的影响,而低通气率没有显著影响。在黄花蒿细胞培养过程中,采用两段培养法可得到较高的青蒿素产量,第一段在含有0.2~0.4 g/L BA和3~4 mg/L的IAA的氮培养基中进行增殖培养,第二段将培养好的细胞转入含0.2~0.4 mg/L的BA和0.2~0.4 mg/L IAA的改良氮培养基中进行青蒿素的合成,青蒿素产量(干重)可达到190 μg/g。在黄连两段培养中,先在生长培养基中生长3周,然后在合成培养基中培养3周,其生物碱量可达556 mg/L。

2.7 细胞固定化培养:固定化技术是指利用化学或物理手段将有利的细胞限制在特定空间内或表面上,在适宜的条件下有利于产物的释放和反复利用的一种工艺技术,利于非耦联生长的植物细胞次生代谢产物的合成,改善转质,生长阶段可以有效地分开,改变微环境,降低生产成本。1979年 Brodelius首次成功地利用固定化的海巴戟、毛地黄和长春花生产次生代谢产物。于荣敏等进行了银杏细胞固定化培养及其影响因素研究,利用银杏细胞固定化培养法生产银杏内酯。以聚胺酯泡沫为固定化材料,考察各种因素对固定化银杏细胞培养的影响,用高密度、小孔径聚胺酯材料P29,切成0.5 cm×0.5 cm×

0.5 cm的小块,每瓶加0.72 g载体,加65 mL液体培养基(MS+2,4-D在8.0 mg/L+KT 0.04 mg/L+NAA 0.4 mg/L),接种鲜重200 g/L,可得到71%的固定化比例,载体上细胞密度为干重22 mg/cm³。表明以聚胺酯泡沫为固定化材料进行银杏细胞固定化培养具有方法简便、成本低廉、细胞固定化比例高等优点,具有潜在的应用价值^[5]。薛莲等用主要成分为壳聚糖的微生物絮状生物活性载体培养紫草细胞,壳聚糖可刺激细胞次生代谢,每克细胞(干重)紫草宁产量提高到0.916和0.953 g,分别为悬浮培养的12.7倍的6.3倍。

3 结语

药用植物组织培养所涉及的因素如外植体、培养基和培养条件、抗逆性、产物药效成分、脱毒培养等方面研究较为成熟;细胞培养的培养基和培养条件、高产细胞系的筛选、诱导子、产物药效成分、反应器等也有相当研究,特别是对诱导子的种类和作用机制研究是目前研究的热点。随着植物生理、细胞学和次生代谢调控研究的不断深入,新的机制不断被阐明,药用植物的组织和细胞培养的工业化也将不断应用。

References:

- [1] Chen W, Gao W Y, Jia W, et al. Advances in studies on tissue and cell culture in medicinal plants of *Panax* L. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(4): 616-620.
- [2] Ran M X. *Chinese Materia Medica Tissue Culture Practice Technology* (中药组织培养实用技术) [M]. Beijing: Science Press, 2004.
- [3] Zhang M, Huang H R, Wei X Y. Advances in study on artificial seed of plant [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2000, 17(5): 407-412.
- [4] Li M F, Liu X M, Liu B, et al. Effect of hormones on callus growth and diosgenin synthesis in callus of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright [J]. *J Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2002, 22(3): 71-73.
- [5] Yu R M, Gao Y, Lü H C, et al. Cell immobilization culture of *Ginkgo biloba* and determination of their affecting factors [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(7): 803-808.
- [6] Chen S A, Wang X D, Zhao B, et al. Screening of *Crocus sativus* L. callus lines for crocin production [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2004, 21(4): 455-460.
- [7] Li D J, Wei J F, Zhang J X, et al. Advances in study on antibrowning reagents in cell culture of *Taxus* L. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(7): 834-836.
- [8] Wang Y H, Xu W J, He J R, et al. *Phellodendron in vitro* culture and effective composition control anti-germs test [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(10): 1002-1003.
- [9] Sun R Q, Guo Z G, Liu R Z, et al. Comparison on ingredients between cultured cell and cultivated saffron pistils [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(9): 850-853.

27.94 (C-23), 27.42 (C-15), 25.08 (C-12), 23.70 (C-2), 21.33 (-OCH₃), 20.93 (C-11), 19.28 (C-30), 18.19 (C-6), 17.99 (C-28), 16.49 (C-24), 16.18 (C-25), 15.96 (C-26), 14.50 (C-27) 并且与文献对照一致^[1], 确定化合物 I 为羽扇豆醇乙酸酯。

化合物 II: 淡黄色针状结晶, 7 mg, 分子式 C₁₀H₈O₄, ESI(+): 193. ¹H-NMR 与 ¹³C-NMR 光谱数据与文献对照一致^[2], 确定化合物 II 为东莨菪内酯。

化合物 N: 白色粉末, 18 mg, 分子式 C₂₃H₃₄O₅, ESI(+): 391. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 5.88 (1H, s, H-22), 4.99 (1H, d, J=18 Hz, H-21), 4.82 (1H, d, J=18 Hz, H-21), 4.18 (1H, br. s, H-3), 2.79 (1H, q, J=6, 14 Hz, H-17), 0.94 (3H, s, CH₃-19), 0.88 (3H, s, CH₃-18). ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 174.62 (C-23), 174.60 (C-20), 117.66 (C-22), 85.0 (C-14), 74.62 (C-5), 73.47 (C-21), 67.96 (C-3), 50.61 (C-17), 49.45 (C-13), 40.73 (C-8), 40.63 (C-10), 39.95 (C-12), 38.94 (C-9), 36.78 (C-4), 35.12 (C-6), 32.95 (C-15), 27.85 (C-2), 26.77 (C-16), 24.77 (C-1), 23.68 (C-7), 21.46 (C-11), 16.69 (C-19), 15.69 (C-18) 与文献对照一致^[4], 确定化合物 N 为杠柳苷元。

4 对人乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制作用

采用体外抑瘤实验研究了这4个化合物对

MCF-7 肿瘤细胞增殖的抑制作用。结果见表1。化合物 N 对肿瘤细胞 MCF-7 的增殖有非常强的抑制作用, 其 IC₅₀ 为 (1.006 ± 0.013) μg/mL (远小于顺铂相应的 IC₅₀ 值)。

表1 I~IV 对人乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of compounds I—IV on MCF-7 cells proliferation

质量浓度/(μg · mL ⁻¹)	抑瘤率/%			
	I	II	III	IV
40	—	11.2	3.9	88.3
20	—	6.7	10.9	87.1
10	—	8.8	1.1	85.2
5	—	11.4	5.3	82.1
2.5	—	1.8	15.2	83.0
1.25	—	—	—	59.1
0.625	—	—	—	36.1
0.312 5	—	—	—	5.3

References:

- [1] Guo H L, Zhou J Y. Study on the chemical constituents of *Periploca calophylla* [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 2003, 38(7): 497-499.
- [2] Yu D Q, Yang J S. *Handbook of Analytical Chemistry: NMR Analysis* (分析化学手册·核磁共振波谱分析) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1999.
- [3] Chen D C. *Handbook on Chemical Reference Substance of Traditional Chinese Medicine* (中药化学对照品工作手册) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2000.
- [4] Itokawa H, Xu J P, Takeya K. Studies on chemical constituents of antitumor fraction from *Periploca sepium* Bge. 1 [J]. *Chem Pharm Bull*, 1978, 35(11): 4524-4529.
- [5] 24(9): 63-68.
- [20] Yan H Y, Cao R Q. Relationship between cell developmental stage and shikonin formation in cell culture of *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(3): 264-266.
- [21] Hu P, Yuan Y J. Effect of elicitor and precursors on cell culture of *Taxus* [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2002, 33(5): 223-225.
- [22] Wang Y D, Lu M, Yuan Y J. Cell metabolism of *Taxus chinensis* var. *maiirei* in suspension cultures treated with methyl jasmonate [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(1): 27-30.
- [23] Liu J, Ding J Y, Zhou Q Y, et al. Studies on influence of fungal elicitor on hairy root of *Panax ginseng* biosynthesis ginseng saponin and biomass [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 39(4): 302-304.
- [24] Yang S H, Liu X F, Guo D A, et al. Effect of phytohormones and elicitors on growth and anthraquinone production of *Cassia obtusifolia* hairy roots [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(5): 752-756.
- [25] Ye Min, Dai J G, Guo D A. Biotransformation of cantharidin by cell suspension cultures of *Platycodon grandiflorus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(10): 869-871.
- [26] Luo J P, Cha X Q, Jiang S T. Suspension culture of protocorm-like bodies from the endangered medicinal plant *Dendrobium huoshanense* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(7): 611-614.
- [27] Li C D, Hu T Q, Sheng C Z, et al. Studies on active constituents obtained from medicinal plants by cell culture [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(7): Attach 7-10.
- [28] Xing J M, Zhao D X, Li M Y, et al. Advances in the production of flavonoids by plant cell cultures [J]. *Prog Biotechnol* (生物工程进展), 2001, 21(1): 47-50.
- [10] Xie D Y, Ye H C, Li G F. The progress of *Artemisia annua* research — the application of biotechnology and prospects [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 1995, 12(4): 28-31.
- [11] Zhao P J, Gang F Y, Zhu N, et al. Studies on tissue culture of *Cynanchum otophyllum* and calli chemical constituents [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2003, 20(5): 565-571.
- [12] Fen Y, Xue Q Z. Progress in micropropagation of disease-free ginger [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2002, 19(4): 439-443.
- [13] Xue P S, Luan Y S, Liu J W, et al. Study on production of virus-free bulblets by adventitious bud culture in *Lilium spp.* [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2003, 20(3): 313-318.
- [14] Xu M S, Huang L Q, Chen M L, et al. Effect of factors on callus biomass and synthetic mass of hypericin in *Hypericum perforatum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(10): 921-923.
- [15] Zhao D X, Li M Y. Effects of media on the production of flavonoids by suspension cultures of *Saussurea medusa* [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2000, 16(1): 99-102.
- [16] Chen Y Z, Lu C F. Freezing tolerance of calli and suspension cell cultures in alpine plant *Saussurea medusa* Maxim. [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2002, 19(2): 219-223.
- [17] Cao Y L, Xu X M, Song Y X, et al. Establishment of high efficient regeneration system from protoplast of *Lycium barbarum* L. [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2001, 18(5): 605-614.
- [18] Dai J G, Zhu W H, Wu Y Q, et al. Studies in single cell cloning of *Ginkgo biloba* L. [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(10): 593-596.
- [19] Zhao K, Zhou D P, Ping W X, et al. Study on the mutagenesis of taxol-producing fungus *nodulisporium sylviforme* protoplast [J]. *China Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2004,

(上接第491页)