

獐牙菜属药用植物叶片表皮细胞的计算机图像分析

陈家春^{1*}, 胡 衡³, 贾敏如²

(1. 华中科技大学同济药学院, 湖北 武汉 430030; 2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610037;

3. 武汉马应龙药业股份公司, 湖北 武汉 430074)

摘要:目的 研究獐牙菜属药用植物叶上表皮细胞的形态差异, 为本类药材的鉴别提供新的方法。方法 采用常规技术制片, 用计算机细胞分析系统 HPIAS-1000 对表皮细胞形态进行二值化处理, 测定其上表皮细胞垂周壁弯曲程度即形态因子 (SFC) 和细胞排列方式即 Feret's 直径比 (SLF)。分别对 12 种獐牙菜属药用植物含不同产地的 21 种材料进行了测定, 并进行了方法学考察。结果 显微镜放大倍数组合 20×10 下, 软件系统精密度和重现性良好, 不同植株茎上第 3 节叶片中段主脉与第 1 侧脉 (弧行脉序) 之间上表皮细胞形态在种内最为稳定, 不同种植物的 SFC、SLF 值有显著差异, 每种都有其相对恒定值。结论 计算机细胞分析系统 HPIAS-1000 用于药用植物叶片表皮细胞的形态分析鉴定具有简便、快速、准确、实用的特点, 为全草和叶类药材的鉴定提供了一种新途径。

关键词:獐牙菜属; 叶表皮细胞; 计算机图像分析

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)04-0592-04

Image analysis on epidermal cells of leaves in medicinal plants of *Swertia* L.

CHEN Jia-chun¹, HU Heng³, JIA Min-ru²

(1. Tongji Pharmaceutical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610037, China;

3. Wuhan Mayinglong Pharmaceutical Co., Ltd., Wuhan 430074, China)

Abstract: **Objective** To study the shape differences of upper epidermal cells in leaves of medicinal plants of *Swertia* L. and establish the new method for identifying them. **Methods** The epidermis were mounted in ordinary technique, and then scanned and binarized through HPIAS-1000 image analytic system. The waveness of the anticlinal walls (SFC) and the ratio of the Feret's diameter (SLF) of upper epidermal cells were detected. The leaf epidermal cells of 21 kinds of raw materials in 12 plants of *Swertia* L. from various regions were examined. **Results** The precision and reproducibility of software system were good, and the shape characters of the upper epidermal cells of the middle lamina in the third node arising from ground are the stablest inside the same species by the magnification 20×10 under microscope. The SFC and SLF of the upper epidermal cells of the same species of plants are relatively constant, conversely that of different species of plants are obviously different and distinguishable from each other. **Conclusion** The proposed method is a useful technique for identifying traditional Chinese medicinal materials originated from herbs and leaves of plants. HPIAS-1000 is simple, rapid, accurate, and practical for shape analysis of upper epidermal cells of plant leaf.

Key words: *Swertia* L.; upper epidermal cells of leaf; HPIAS-1000 image analytic system

龙胆科獐牙菜属 (*Swertia* L.) 药用植物是我国重要的民族民间药物, 药用全草, 具有清肝利胆、清热利湿之功效。本属不同品种在《中国药典》和我国部颁药品标准及湖北和云南等省地方药材标准中均有收载^[1]。近年来, 还从本属药用植物中研制开发了藏茵陈胶囊、蒂达胶囊和紫金肝泰胶囊等新药制剂。本属中已进行过生药鉴别研究的药用植物有 20 余种, 发现本属植物的一般形态和组织构造在种间

极其相似, 不易区别, 常常引起混用^[2,3]。并观察到其叶片上表皮细胞的形状、垂周壁弯曲程度、排列方式等种间存在一定差异, 但难以用文字准确表述。为此本研究试图利用计算机图像分析技术 (image analysis technique), 对叶片上表皮细胞垂周壁弯曲程度和细胞排列方式等特征进行数值化, 为该类药物材的鉴别提供新途径。

1 材料与仪器

收稿日期: 2006-10-19

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (30271590)

* 通讯作者 陈家春 Tel: (027) 61033112 E-mail: homespringchen@sohu.com

本实验所用的材料采集于四川和湖北两省,并经笔者鉴定其学名。凭证标本保存于华中科技大学同济药学院中药标本馆(TJCM)。

图像分析仪系由荧光显微镜—松下彩色 CCD 摄像机—图像采集板—PC 打印机等部分组成;所用的图像分析软件系统为华中科技大学同济医学院开发的“HPIAS—1000 高清晰度彩色病理图文分析系统”。

2 方法

2.1 取材与制片

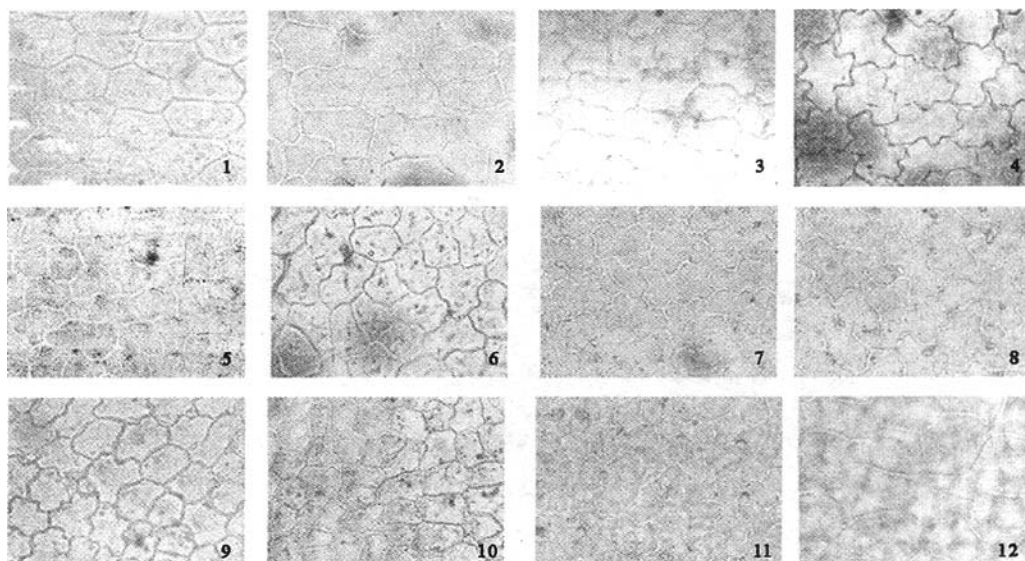
2.1.1 取材:方法学考察实验中放大倍数的确定、精密度和重现性考察均取植株茎上第3节叶片中部的上表皮,比较观察根据需要取不同部位的叶片上

表皮比较分析,确定最稳定的部位,作为样品测定的观察部位。样品测定选取最稳定部位的叶片,即取开花植株第3节叶片的主脉与第1侧脉(弧行脉序)之间中部叶片。对每种样品取10株,每枚玻片测定50个细胞。

2.1.2 制片:制片方法为镊子撕取上表皮,水合氯醛试液加热透化,稀甘油装片。

2.2 图像分析:在光学显微镜下观察,并摄取其图像,用计算机细胞分析系统(HPIAS—1000)对其进行二值化处理。处理完毕,系统将自动对其上表皮细胞的有关参数进行测量和统计。所观察植物叶的上表皮细胞见图1。

图像分析的理论依据:根据公式 Waveness



1-红直獐牙菜 2-二叶獐牙菜 3-折连獐牙菜 4-川东獐牙菜 5-獐牙菜 6-显脉獐牙菜 7-北方獐牙菜

8-大籽獐牙菜 9-川西獐牙菜 10-贵州獐牙菜 11-紫红獐牙菜 12-西南獐牙菜

1-*S. erythrosticta* 2-*S. bifolia* 3-*S. przewalskii* 4-*S. davidii* 5-*S. bimaculata* 6-*S. nervosa*

7-*S. diluta* 8-*S. macrosperma* 9-*S. mussotii* 10-*S. kouitchensis* 11-*S. punicea* 12-*S. cincta*

图1 12种獐牙菜属植物叶上表皮细胞

Fig. 1 Surface views of upper epidermal cells of leaves in 12 plants of *Swertia* L.

$SFC = (\text{Perimeter})^2 / (4\pi \times \text{Area})$ 计算垂周壁弯曲程度即形状因子(SFC),SFC值越大,说明周长相对较长,弯曲程度就越大。计算表皮细胞排列方式时,以平行主脉方向为纵坐标,垂直主脉方向为横坐标,分别测定细胞在两个方向的直径;以纵坐标方向直径(Feret's diameter Y, FY)与横坐标方向直径(Feret's diameter X, FX)的比值即 Feret's 直径比(FY/FX=SLF),来判断表皮细胞纵向延长还是横向延长;SLF值大于1,表明纵向延长细胞占优势,小于1表明横向延长细胞占优势。

3 结果

3.1 放大倍数的确定:取红直獐牙菜 *S. erythrosticta* Maxim. 茎上第3节叶片1枚制作上表面片,在光学显微镜下分别用 5×10 , 10×10 , 20×10 , 40×10 放大倍数采集图像,各测定相同的50个细胞的平均SFC值分别为1.669 0, 1.197 3, 1.240 3, 1.241 7;RSD分别为6.32%, 4.84%, 2.35%, 2.31%,故本实验选定 20×10 进行测量。

3.2 软件系统精密度考察:取红直獐牙菜茎上第3节叶片1枚,制作上表面片, 20×10 镜下采集图像,测定相同的50个细胞的平均SFC值,重复10次。10次测定结果分别为1.250 3, 1.249 8, 1.238 4,

1.234、1.237 5、1.250 2、1.240 8、1.199 1、1.241 0、1.230 1,RSD 为 2.389 7% ($n=10$),10 次测量均数之间变异较小,说明 HPIAS—1000 系统精密密度良好。

3.3 重现性考察:取同批红直獐牙菜 10 株,每株取其茎上第 3 节叶片,制作叶片中部的上表面片,20×10 镜下采集主脉与第 1 侧脉之间的图像,测定 50 个细胞的平均 SFC 值。10 株的平均 SFC 值分别为 1.240 2、1.223 1、1.234 7、1.242 1、1.255 8、1.242 1、1.237 2、1.235 8、1.241 3、1.232 3,RSD 为 2.378 2% ($n=10$),表明同种不同植株均数之间变异较小,此方法重现性良好。

3.4 同一叶片不同观察部位的比较分析:取同批红直獐牙菜叶片 10 枚,每枚分别制作 9 片上表面片: A₁、A₂、A₃、B₁、B₂、B₃、C₁、C₂、C₃,字母 A、B、C 分别代表将叶片按长度平均分割为叶尖部、叶中部、叶基部,数字 1、2、3 分别代表主脉与第 1 侧脉(弧形脉序)之间、第 1 侧脉与第 2 侧脉之间、第 2 侧脉与叶缘之间部分叶片。在 20×10 镜下采集图像,分别测定 10 枚叶片的平均 SFC 值,所得结果见表 1。

表 1 叶片不同部位 SFC 数值统计表 ($n=10$)

Table 1 Statistics of SFC in leaves' variant parts ($n=10$)

不同部位	形状因子 (SFC)	RSD (%)
A ₁	1.210 7	3.27
A ₂	1.252 9	5.78
A ₃	1.236 9	8.73
B ₁	1.247 7	2.92
B ₂	1.237 6	4.14
B ₃	1.258 0	6.49
C ₁	1.241 9	3.81
C ₂	1.250 2	6.49
C ₃	1.262 1	9.70

由表 1 可知,比较叶片不同部位,叶中部的主脉与第 1 侧脉之间叶片 (B₁片) 的上表皮细胞 SFC 值变异最小,说明该部位叶片上表皮细胞形态最稳定,受株间影响较小。

同时进行 SLF 值测定,得到以上相同结论,由此可知,叶中部的主脉与第 1 侧脉之间叶片 (B₁片) 的上表皮细胞形态最为稳定。

3.5 同一植株茎不同节上生长的叶片的比较分析:取同批红直獐牙菜 10 株,每株分别取茎上第 1(基部)、第 2、第 3 和第 4 节的叶片,参照 3.4 方法,各制作 B₁片。测定 SFC、SLF 值,结果见表 2。

从表 2 可知,比较植株不同节上叶片,茎上第 3 节叶片的中部主脉与第 1 侧脉之间叶片 (B₁片) 的测量值变异最小,即此处上表皮细胞形态株间最稳

表 2 不同节上叶的 SFC 和 SLF 数值统计表 ($n=10$)

Table 2 Statistics of SFC and SLF of leaves in variant nodes ($n=10$)

部位	均值	RSD/%
SFC 基部	1.235	5.01
第 2 节	1.240	3.37
第 3 节	1.239	2.32
第 4 节	1.234	2.98
SLF 基部	0.667	5.24
第 2 节	0.671	4.10
第 3 节	0.633	2.82
第 4 节	0.648	4.71

定,受种内不同植株因素的影响较小。

3.6 样品测定:取 12 种獐牙菜属药用植物含不同产地的药材 21 份,每份取 10 株,参照 3.4 的方法分别制取 B₁片,按 2.2 项下进行图像分析,结果见表 3。

4 讨论

图像分析技术是近 30 年来兴起的一门新技术,此技术将二维图像通过摄像机摄入后,由计算机进行分析处理,从而得出有关此图像的定量数据。国内外生药学者采用此技术分别对横切面上油管、导管、厚壁细胞占横切面的面积比值^[4,5],细小果实及种子、花粉粒的体积、周长、直径、不规则参数^[6,7],叶的气孔面积、直径、周长及不规则参数^[8]等不同形态组织学参数进行过测定;山路^[4]等首次测定了叶表皮细胞垂周壁弯曲程度 SFC。本次研究成果进一步丰富了该领域的研究内容。

叶片表皮细胞形态特征在全草和叶类生药鉴别中具有重要意义,但是长期以来大多仅凭经验作定性描述,不同的观察者、甚至同一观察者在不同时间对同一样品可能做出不同的结论,如细胞壁的弯曲程度经常描述为平直、微弯曲、波状弯曲、弯曲等,其准确的弯曲程度难以判断。利用计算机图像分析技术对 12 种獐牙菜属药用植物叶上表皮细胞垂周壁弯曲程度 SFC 和细胞排列方式 SLF 二个参数进行测量,并用统计学方法考察了方法的稳定性,得到以下结论:①同一植株不同节上的叶片上表皮细胞形态不同,而且同一叶片的叶尖、叶中、叶基、叶缘的细胞形态也不相同,因此进行显微观察时,固定取材部位极其重要。②茎上第 3 节叶片中段主脉与第 1 侧脉之间表皮细胞形态在种内最为稳定。据作者长期野外和大量的标本观察,该处叶片生长发育成熟,且不枯萎,适应了所生长的环境,外部形态稳定,可以作为最佳的取材部位。③所观察獐牙菜属不同种植物的 SFC、SLF 值在种间有显著差异,在种内都有其相对恒定值,因此可作为生药鉴定的新指标。

表 3 样品叶片上表皮细胞的计算机图像分析结果 (n=10)

Table 3 Computer image analysis of upper epidermal cells in leaves of samples (n=10)

名 称	采集地	凭证标本	形状因子 (SFC) ($\bar{x} \pm s$)	Feret's 直径比 (SLF) ($\bar{x} \pm s$)
红直獐牙菜 <i>S. erythrosticta</i>	四川康定	TJCM20010911	1.241±0.034	0.73±0.024
	四川马尔康	TJCM20010922	1.282±0.014	0.76±0.064
二叶獐牙菜 <i>S. bifolia</i>	四川马尔康	TJCM20010919	1.401±0.024	0.84±0.062
折连獐牙菜 <i>S. przewalskii</i>	四川巴郎山	TJCM20010901	1.532±0.035	0.88±0.245
川东獐牙菜 <i>S. davidii</i>	湖北来凤	TJCM870010	1.888±0.014	1.09±0.073
獐牙菜 <i>S. bimaculata</i>	四川泸定	TJCM20010915	1.397±0.016	0.91±0.127
	湖北建始	TJCM870010	1.390±0.038	0.97±0.221
显脉獐牙菜 <i>S. nervosa</i>	湖北鹤峰	TJCM870027	1.592±0.034	1.08±0.081
	湖北建始	TJCM870003	1.549±0.027	1.13±0.093
	湖北建始	TJCM870003	1.568±0.014	1.06±0.194
北方獐牙菜 <i>S. diluta</i>	四川金川	TJCM20010921	2.160±0.040	1.03±0.072
大籽獐牙菜 <i>S. macrosperma</i>	四川泸定	TJCM20010914	1.612±0.025	0.79±0.048
	湖北宣恩	TJCM8808	1.621±0.021	0.85±0.128
川西獐牙菜 <i>S. mussoitii</i>	四川卧龙	TJCM20020906	1.465±0.031	1.43±0.054
贵州獐牙菜 <i>S. kouitchensis</i>	四川康定	TJCM20010909	1.488±0.056	1.52±0.079
	湖北建始	TJCM870015	1.494±0.042	1.53±0.147
	湖北建始	TJCM870015	1.484±0.020	1.51±0.041
紫红獐牙菜 <i>S. punicea</i>	四川泸定	TJCM20010916	2.231±0.032	0.92±0.070
	湖北宣恩	TJCM870038	2.225±0.018	0.91±0.047
	湖北建始	TJCM870014	2.228±0.035	0.93±0.170
西南獐牙菜 <i>S. cincta</i>	四川泸定	TJCM20010913	1.342±0.027	0.86±0.067

④HPIAS—1000 高清晰度彩色病理图文分析系统能够用于全草和叶类药材表皮细胞的图象分析,并具有简便、快捷、准确、实用的特点。

References:

[1] Chen J C, Namba T, Wan D R, et al. Systematization of ethnopharmacy from *Swertia* plants [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族医药杂志), 1999 (37): 98-101.
 [2] Chen J C, Namba T, Yamaji S, et al. Histological studies on the leaves of medicinal *Swertia* [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 2000, 18(1): 1-6.
 [3] Chen J C, Komatsu K, Namba T, et al. Pharmacognostical studies of the Chinese folk medicines, Zhang Yacai and Qing Yedan [J]. *Nat Med*, 2001, 55(4): 165-173.
 [4] Yamaji S, Komatsu K, Mikage M, et al. Pharmacognostical studies of the Tibetan crude drugs on "Bya-rkang" derived

from the plants of Genus *Delphinium* subsect. *Grandiflora* [J]. *J Jpn Bot*, 1994, 69(2): 69-83.

[5] Zhou G C, Komatsu K, Yamaji S, et al. Pharmacognostical studies on the traditional drugs used by Chinese minority race, called "Yi" (1) on "A-ji-ba-mo" derived from *Dipsacus* plants [J]. *Nat Med*, 1994, 48(2): 131-140.
 [6] Dong G M, Zhang H M, Zheng H C, et al. Image analysis of *Curculigo* plants pollens [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 1994, 15(3): 233-235.
 [7] Qin L P, Su Z W, Li C G. Studies on *Cnidium* fruits by stereological method and computer image analysis [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1996, 21(1): 9-11.
 [8] Qin L P, Zhang H M, Zheng H C. Computer image analysis of stoma in 15 species of folium materia medica [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 1996, 17(5): 481-482.

空心胶囊 商 讯

绍兴中亚胶囊有限公司是与马来西亚合资的专业生产销售药用空心胶囊的生产企业,地处唐诗之路天姥山麓,104 国道,风景秀丽、环境幽雅、气候宜人,对药品(胶囊)生产有着得天独厚的自然条件。

公司严格按照 GMP 标准规范生产,产品指标完全达到并超过《中国药典》2005 年版标准。是国家食品药品监督管理局空心胶囊定点生产企业。公司年产空心胶囊 50 亿粒,严格选用优质药用明胶为原料生产 00#、0#、1#、2#、3#、4# 和安全胶囊 A、B 型等不同规格、颜色的机制硬胶囊;并且已成功开发了植物胶囊并出口世界各地。

在满足各制药企业的同时,公司又为方便医院诊所和科研机构等,开设小客户服务中心,零售空心胶囊及与之配套的胶囊套合板、胶囊填充机等胶囊制剂设备,热忱欢迎各胶囊制剂单位来电咨询。公司先进的全自动胶囊生产线与高素质的企业员工向您承诺,携手中亚是您明智的选择。

地址:浙江省新昌县儒岙镇 邮编:312560 联系人:张小姐

电话:0575-6060562 E-mail: feima666@126.com