

- [4] 张玉红,王 洋,阎秀峰. 喜树种子萌发和幼苗发育过程中喜树碱含量的变化[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(6): 575-577.
- [5] Liu Z, Carpenter S B, Bourgeois W J, et al. Variations in the secondary metabolite camptothecin in relation to tissue age and season in *Camptotheca acuminata* [J]. *Tree Physiol*, 1998, 18(4): 265-270.
- [6] Lopez-Meyer M, Nessler C L, McKnight T D. Sites of accumulation of the antitumor alkaloid camptothecin in *Camptotheca acuminata* [J]. *Planta Med*, 1994, 60(6): 558-560.
- [7] Valletta A, Santamaria A R, Pasqua G. CPT accumulation in the fruit and during early phases of plant development in *Camptotheca acuminata* Decaisne (Nyssaceae) [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(14): 1248-1255.
- [8] 杨 磊,李晓娟,赵春建,等. 喜树生物碱在喜树株中的分布[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(5): 1-4.
- [9] Lorence A, Nessler C L. Camptothecin, over four decades of surprising findings [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(20): 2735-2749.
- [10] 张显强,乙 引,洪 鲲,等. 喜树各器官喜树碱(CPT)含量变化分析[J]. 贵州师范大学学报, 2004, 22(4): 12-14.
- [11] Pasqua G, Monacelli B, Valletta A. Cellular localisation of the anti-cancer drug camptothecin in *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae) [J]. *Eur J Histochem*, 2004, 48(3): 321-327.

秦艽细胞悬浮培养研究()

齐香君,陈如意,王 薇

(陕西科技大学生命科学与工程学院,陕西 西安 710021)

摘 要:目的 建立秦艽细胞悬浮培养体系。方法 通过小细胞团法优选细胞系并考察不同培养基、细胞种龄、初始pH值、培养温度、摇床转速对秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷积累的影响。结果 适于秦艽细胞悬浮培养条件为:MS培养基为基本培养基,用15 d种龄的细胞接种,初始pH7.25, 110 r/min,摇瓶培养。结论 通过摇瓶培养建立了良好的秦艽细胞悬浮培养体系。不同培养基对细胞生长及龙胆苦苷积累的显著影响提示某些无机离子有重要的调控作用。

关键词:秦艽;龙胆苦苷;悬浮培养;培养条件

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)03-0472-04

Cell suspension culture of *Gentiana macrophylla* ()

QI Xiang-jun, CHEN Ru-yi, WANG Wei

(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract : Objective To establish cell suspension culture system of *Gentiana macrophylla*. **Methods** Good cell line was selected by the methods of small cell aggregate and the effects of different media, inoculation age of cells, initial pH value, culture temperature, and rotation speed on cell growth and gentiopicroside accumulation were investigated. **Results** The eligible cell suspension culture conditions were: MS media as the basic medium, cells with inoculation age of 15 d, initial pH 7, and rotation speed of 110 r/min at 25℃, culturing in Erlenmeyer flasks. **Conclusion** Optimal cell suspension culture system of *G. macrophylla* has been established by shake flasks. The different effects of media on cell growth and gentiopicroside accumulation indicate that some inorganic ions have significant effects on regulation.

Key words: *Gentiana macrophylla* Pall.; gentiopicroside; suspension culture; culture condition

秦艽是我国重要的传统中药,其主要有效成分龙胆苦苷具有良好的保肝、健胃、利胆、抗炎、抗菌等作用^[1~4],目前已被开发为滴丸及胶丸等新药上市。但野生秦艽由于过度采挖临近濒危状态,栽培品种也因产量有限,远不能满足市场所需^[5]。李向阳等^[6]对青海栽培秦艽中龙胆苦苷的影响因素考察,

从而为科学合理地种植秦艽提供重要依据。植物细胞培养生产次生代谢产物具有不受环境限制,生产周期短等优点,用秦艽细胞培养来生产龙胆苦苷可较好地解决药材资源及可持续发展问题。目前秦艽组培研究多限于愈伤组织诱导及植株再生,曹建平^[7]对秦艽毛状根诱导进行了研究,但尚未建立其

收稿日期:2009-06-12

基金项目:西安市科技局项目(YF07118)

作者简介:齐香君(1957—),女,河南博爱人,陕西科技大学生命学院院长,教授,长期从事生物制药及发酵代谢调控方向的教学、科研工作。
Tel: (029) 86168590 Fax: (029) 86168293 E-mail: qixj@sust.edu.cn

生产龙胆苦苷的培养体系,赵强^[8]对秦艽中产龙胆苦苷的内生菌进行了筛选研究,秦艽细胞的悬浮培养未见报道。本实验目的在于建立秦艽细胞悬浮培养体系,为后期龙胆苦苷代谢调控及工业化生产龙胆苦苷奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料:秦艽愈伤组织:以秦艽叶片为外植体经消毒后,在附加 2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 的 MS 培养基上诱导并经增殖继代 15 ~ 20 次的外表呈黄白色,质地松软的愈伤组织。龙胆苦苷对照品购自中国药品生物制品检定所(批号 110770-200510)。

1.2 培养方法:将愈伤组织定量转接到附加 2,4-D 1.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 的 MS 液体培养基(MS₀)中,于初始 pH 5.8,25 ℃,110 r/min 条件下摇床暗培养,12 d 后筛选生长迅速、较均一的小细胞团定量(4 g/100 mL 湿质量)接种至装有 50 mL 新鲜培养液的 100 mL 三角瓶中同条件培养 28 d。

1.3 悬浮细胞生长的测定:培养液于 3 850 r/min 转速下离心 30 min,收集沉淀细胞,于 100 ℃ 灭酶 30 min 后 60 ℃ 干燥至恒重,冷却后称质量,以每升培养液中细胞干质量计算。每个条件设 3 个平行,取其平均值,并计算标准偏差。

1.4 龙胆苦苷量的测定:精密称取研细的干细胞 1.000 g,70%乙醇回流提取 60 min,滤过,放冷,定容到 25 mL,摇匀即得秦艽细胞粗提物,以 0.45 μm 微孔滤膜滤过后用 HPLC 法测定,采用 SY-4000 K (德国 KNAUER)高效液相色谱仪,色谱柱:化学键合型十八烷基柱 (SciC₁₈);流动相:甲醇-水(20:80);检测波长:270 nm;柱温:室温;体积流量:1 mL/min。龙胆苦苷产量以细胞干质量与龙胆苦苷量的乘积计算,单位为 mg/L。每个条件设 3 个平行,取其平均值,并计算标准偏差。

1.5 细胞系的筛选:方法参考刘佳佳等^[9]的研究:选择正在生长、组织疏松的愈伤组织,夹碎后接种在加有玻璃珠的 MS₀ 液体培养基中,110 r/min 振荡培养 5 d 后,调整细胞密度,取一定量的细胞悬液与冷却至 35 ℃ 以下的 MS₀ 固体培养基混匀,倒于直径 9 cm 平板上密封培养。20 d 后挑出存活的细胞团接入新的培养基上培养,继代过程中剔除与原细胞团颜色结构不一致的细胞。每 30 d 继代一次,继代 4 次后测定其生长量和龙胆苦苷积累量并与原来愈伤组织中龙胆苦苷的积累量进行比较。

1.6 数据处理:采用 EXCEL 软件对试验数据进行

方差分析。

2 结果

2.1 小细胞团法筛选悬浮细胞系:为了得到适于悬浮培养的细胞系,本试验采用小细胞团法对秦艽细胞进行筛选。结果在挑出的 287 个小细胞团中,有 247 个成活,选出小细胞团的再生率达 86.06%。继代培养 4 次后,细胞中龙胆苦苷的量由筛选前的 0.863 mg/g 上升至 0.956 mg/g,提高了 10.78%,但是生物量却从 11.55 g/L 提高到 25.13 g/L,约是筛选前的 2.18 倍。将细胞在固体培养基上继续继代 2 次后,挑选生长旺盛的细胞团进行悬浮培养,所获得的悬浮培养体系分散性良好,显微镜下观察,细胞形状和细胞团大小大致相同。培养一段时间发现细胞生长迅速,因此该法对筛选秦艽优良悬浮细胞系有一定作用。

2.2 培养基的筛选:培养基差别主要表现在盐的组成上,其对植物细胞生长和次生代谢产物的积累有较大的影响^[10]。为考察不同培养基对秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷积累的影响,本试验分别将秦艽细胞接种在 MS、B5、N6 和 White 培养基中培养,28 d 后测定细胞生长量和龙胆苦苷量,结果如表 1,不同培养基对秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷积累的影响差异很大($P < 0.01$),从细胞生长看,4 种培养基中,无论是高盐的 MS 培养基,还是高硝酸钾的 B5 或 N6 培养基均对秦艽悬浮细胞生长有不同程度的促进作用,而低无机盐的 White 培养基却不利于秦艽悬浮细胞生长,并且使悬浮细胞容易聚集成团,逐渐变为活力较弱的黄褐色细胞团块,这可能是由于某些盐份或离子浓度过低导致秦艽细胞某些功能被抑制,从而影响了细胞生长。4 种培养基利于秦艽细胞生长的顺序是:MS > B5 > N6 > White。从龙胆苦苷量看,最优的是 MS 培养基,可达 1.001 mg/g。因此,MS 培养基为筛选的最佳培养基。

表 1 培养基对秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷积累的影响
($n = 3$)

Table 1 Effects of media on cell growth and gentiopicroside accumulation ($n = 3$)

培养基	细胞干质量/ (g · L ⁻¹)	龙胆苦苷/ (mg · g ⁻¹)	龙胆苦苷产量/ (mg · L ⁻¹)
MS	8.59 ± 0.17	1.001 ± 0.030	8.60 ± 0.38
B5	7.87 ± 0.10	0.458 ± 0.041	3.60 ± 0.35
White	3.38 ± 0.15	0.331 ± 0.012	1.12 ± 0.07
N6	5.54 ± 0.13	0.478 ± 0.014	2.65 ± 0.03

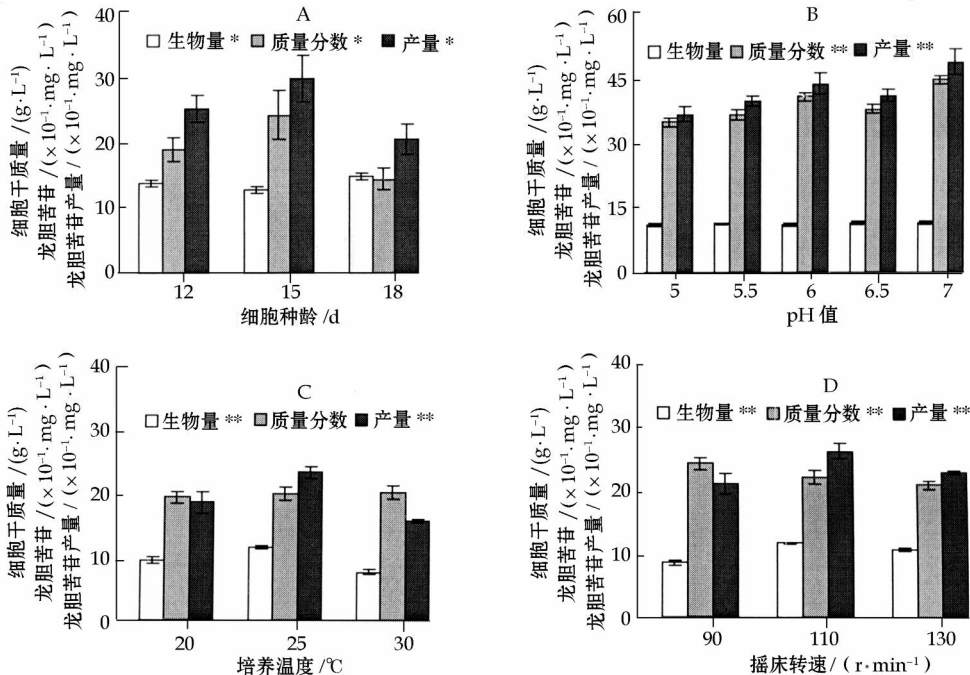
2.3 细胞种龄对秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷积累的影响:处于不同生长时期的细胞,其生理状况不同,

细胞内的代谢活动也有较大的差别^[11]。为考察细胞种龄对秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷积累的影响,将分别处于对数生长初期、中期、末期,即培养了 12、15、18 d 的秦艽悬浮细胞分别接种到新鲜的 MS₀ 液体培养基中培养,其他条件同 1.2, 28 d 后收获。结果显示(图 1-A),细胞种龄对秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷量都有显著影响($P < 0.05$),种子液培养 18 d 接种后培养,细胞干质量最大,为 14.27 g/L,而细胞种龄为 15 d 时龙胆苦苷量最高,为 0.234 mg/g。以龙胆苦苷产量为指标考虑,15 d 的细胞种龄接种最佳。

2.4 初始 pH 值对秦艽细胞生长及龙胆苦苷积累的影响:pH 值能影响植物细胞对碳源和氮源的吸收,从而影响某些次生代谢产物的积累^[12]。本试验设计 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 的初始 pH 值,其他条件同 1.2 下培养,实验结果表明(图 1-B),不同初始

pH 值对秦艽细胞的生长影响不明显,但对龙胆苦苷的量却有非常明显影响($P < 0.01$),当 pH 值为 7.0 时,龙胆苦苷量(0.488 mg/g)及产量(4.698 mg/L)最高。因此 pH 7.0 为优化的培养条件。

2.5 培养温度对秦艽细胞生长及龙胆苦苷积累的影响:温度不仅影响细胞内的各种酶的活力,而且还影响培养基中各种组分的物理化学性质,从而影响到细胞对各种组分的吸收、代谢和产物的生成^[13]。本试验考察了 20、25、30 3 个培养温度,其他条件同 1.2 下,秦艽细胞生长及龙胆苦苷积累情况。结果表明(图 1-C),当培养温度为 25 时,细胞生长量(11.68 g/L)最大,培养温度高于或低于 25,细胞生长速度均下降,而龙胆苦苷的量却表现出对温度的不敏感,从龙胆苦苷的产量上来看,25 是最适合的培养温度。



(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

图 1 细胞种龄(A)、初始 pH 值(B)、培养温度(C)和摇床转速(D)的优选

Fig 1 Optimization of inoculation age of cells (A), initial pH value (B), culture temperature (C), and rotation speed (D)

2.6 摇床转速对秦艽细胞生长及龙胆苦苷积累的影响:摇床转速既影响到植物细胞受到的剪切力,又影响到培养体系的传质效果,因而影响植物细胞的生长及次生代谢产物的积累^[14]。由于植物细胞对剪切力敏感,转速太大不适合细胞培养,在其他培养条件不变下,本试验考察了 90、110、130 r/min 转速对细胞生长及龙胆苦苷积累的影响,结果表明(图 1-D),摇床转速显著影响($P < 0.01$)秦艽悬浮细胞生长及龙胆苦苷的合成。细胞在低转速下生长迟

缓,较高转速抑制细胞生长,且细胞出现褐化现象,最适转速为 110 r/min;从龙胆苦苷的量来看,摇床转速在 90 r/min 的处理下最高;从龙胆苦苷产量来看,110 r/min 是本试验体系的最适摇床转速,此时龙胆苦苷的产量为 2.628 mg/L。

3 讨论

本实验采用小细胞团法筛选出优化的细胞系,并通过考察悬浮培养条件(培养基、细胞种龄、pH 值、培养温度、摇床转速)对秦艽悬浮细胞生长及龙

胆苦苷积累影响,建立了能使细胞生长良好,龙胆苦苷积累提高的悬浮培养体系。其优化的培养条件为:MS 培养基为基本培养基,用悬浮培养 15 d 的细胞接种,初始 pH 7.25,110 r/min 下摇瓶培养。培养基对细胞生长及龙胆苦苷积累都有较显著影响,提示某些无机离子可能对细胞生长及龙胆苦苷合成有重要调控作用。本实验体系秦艽悬浮细胞中龙胆苦苷量仍低于原植株,本课题组将从培养方式和代谢调控等诸多方面进行深入研究。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 陈长勋,刘占文,孙峥嵘,等. 龙胆苦苷抗炎药理作用研究[J]. 中草药,2003,34(9):814-816.
- [3] 李艳秋,赵德化,潘伯荣,等. 龙胆苦苷抗鼠肝损伤的作用[J]. 第四军医大学学报,2001,22(18):1645-1649.
- [4] 刘占文,陈长勋,金若敏,等. 龙胆苦苷的保肝作用研究[J]. 中草药,2002,33(1):47-50.
- [5] 吴兴海,黄馨慧,王喆. 中药秦艽及其可持续利用途径研究[J]. 世界科学技术—中药现代化,2002,4(6):58-61.
- [6] 李向阳,李富安,李建民,等. 栽培秦艽中龙胆苦苷的影响因素考察[J]. 中草药,2005,36(8):1237-1239.
- [7] 曹建平. 秦艽的组织培养、发根体系建立及发根中次生代谢产物的变化[D]. 西安:西北大学,2005.
- [8] 赵强. 渐危药用植物秦艽活性成分内生真菌的初步研究[D]. 西安:西北大学,2007.
- [9] 刘佳佳,郭勇,郑穗平,等. 缺氧胁迫小细胞团法选育高产黄酮苷悬浮细胞系[J]. 中南工业大学学报,2001,32(1):41-45.
- [10] 赵德修,李茂寅. 培养基及其组成对水母雪莲悬浮培养生长及黄酮形成的影响[J]. 生物工程学报,2000,16(1):99-102.
- [11] 孙敬三,朱至清. 植物细胞工程实验技术[M]. 北京:化学工业出版社,2006.
- [12] Ramachandra Rao S, Ravishankar G A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites [J]. *Biotechnol Adv*, 2002, 20: 101-153.
- [13] Shibasaki Kitakawa N, Takeishi J, Yonemoto T. Improvement of catechin productivity in suspension cultures of tea callus cells [J]. *Biotechnol Prog*, 2003, 19: 655-658.
- [14] 杨国伟. 茶叶细胞悬浮系的建立及动力学初步研究[D]. 北京:中国农业大学,2004.

鸭跖草生药学研究

张晓玲,张昭*,赵保华,李展,张本刚

(中国医学科学院 北京协和医院药用植物研究所,北京 100193)

摘要:目的 研究鸭跖草的药材性状及显微特征,以完善《中国药典》质量标准。方法 对药材进行性状描述;应用光学显微镜、扫描电镜观察药材粉末及原植物表面特征。结果 药材性状鉴别,总苞和果实存在完整,且鉴别意义较大,在进行药材性状鉴别时应增加其鉴别权重。粉末鉴别,主要以导管、非腺毛、种皮等为特征重点描述。结论 修订药典标准中鸭跖草的性状描述,并增加粉末鉴别。

关键词:鸭跖草;显微鉴别;商品药材

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)03-0475-03

鸭跖草为鸭跖草科鸭跖草属植物鸭跖草 *Commelina communis* L. 的干燥地上部分,主要来源于野生,全国大部分地区均有分布,别名竹叶水草、萤火虫草、竹叶草,土名竹叶青^[1]。具有清热解毒,利水消肿之功效,用于风热感冒,高热不退,咽喉肿痛,水肿尿少,热淋涩痛,痈肿疔毒^[2]。在对广西、安徽、江苏、浙江、江西、山东、河北和新疆药材市场上的鸭跖草药材及饮片进行调研时发现,同属植物饭包草 *C. bengalensis* L. 也作为鸭跖草入药,在鸭跖草药材中还偶见有同属植物节节草 *C. diffusa* Burm. f. 混杂。同时鸭跖草在药材市场上还作为雨

久花科另一种药材鸭舌草 *Monochoria vaginalis* Presl ex Kunth 入药。鸭跖草属植物在外观上较为接近,依据现有《中国药典》描述不易分辨,因此就鸭跖草的药材性状及粉末显微特征进行研究,以期获取更为明确的鉴别特征。因鸭跖草的非腺毛是进行粉末鉴定的重要特征,故采用扫描电镜观察鸭跖草表面,以获得更加准确的观察效果。

1 材料与方法

1.1 材料:观察药材性状和粉末特征的药材及饮片购于广西、安徽、江苏、浙江、江西、山东、河北和新疆药材市场;观察植物表面的新鲜材料来自中国医学

收稿日期:2009-06-07

基金项目:国家药典委员会,中药材鸭跖草的标准修订研究(YS-213)

作者简介:张晓玲(1983—),女,河北石家庄人,硕士,研究方向为中药资源。

Tel: (010) 62899773 E-mail: Zhangxiaoling0117@163.com

*通讯作者 张昭 Tel: (010) 62899773 E-mail: zhangzhao1962@tom.com