

浙江大学学报(农业与生命科学版) 32(1): 56~59, 2006

Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)

文章编号:1008-9209(2006)01-0056-04

八角莲的愈伤组织和组培根及野生根状茎的 鬼臼毒素含量比较研究

潘琦¹, 陈绍媛¹, 姜维梅¹, Gilbert Y S Chan², 傅承新¹

(1. 浙江大学 生命科学学院, 植物系统进化与生物多样性实验室, 浙江 杭州 310029; 2. 香港理工大学 应用生物与化学系, 香港)

摘要: 比较研究了峨眉山野生八角莲根、组培愈伤组织及其诱导根的鬼臼毒素含量, 为八角莲的快速繁殖和利用生物技术生产鬼臼毒素提供科学依据。高效液相色谱技术(HPLC)显示组织培养的八角莲愈伤组织和诱导根中均含有鬼臼毒素, 分别为 0.117% 和 0.148%, 野生品的根中其含量为 0.600%。通过组织培养可在不破坏自然资源的前提下快速生产鬼臼毒素, 从而为开发鬼臼毒素类抗癌药物提供大量原料。

关键词: 鬼臼毒素; 八角莲; HPLC; 组织培养; 抗肿瘤作用

中图分类号: Q943.1; R282.71 **文献标识码:** A

PAN Qi¹, CHEN Shao-yuan¹, JIANG Wei-mei¹, Gilbert Y S Chan², FU Cheng-xin¹ (1. Lab of Plant Systematic Evolution and Biodiversity, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Department of Applied Biology and Chemical Technology, Hongkong Polytechnic University, Hongkong, China)

Study on the podophyllotoxin in the *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng and its Callus' Materials. Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2006, 32(1): 56-59

Abstract: In this study, HPLC was used to detect the podophyllotoxin content in three parts of *Dysosma versipellis* (Hance). The content was 0.60% in the wild root, while in the calli and the induced root from this calli, they were 0.117% and 0.148%, respectively. The results suggest that it is possible to produce podophyllotoxin quickly by tissue culture, and provide much raw material to antitumor drugs with little damage to the natural resources.

Key words: podophyllotoxin; *Dysosma versipellis* (Hance); HPLC; tissue culture; antitumor

八角莲 *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng, 为小檗科 (Berberidaceae) 八角莲属 (*Dysosma*) 植物, 是我国特有的常用中草药, 分布于我国湖南、湖北、浙江、江西、云南、贵州、四川、河南及陕西等地, 其模式标本采自广东罗浮

山^[1]。八角莲根茎具清热解毒之功效, 常用于治疗痈疮疔毒、毒蛇咬伤等。研究表明, 鬼臼毒素 (Podophyllotoxin) 是八角莲的主要成分之一, 具有抗肿瘤、抗病毒等多种生理活性, 是合成 VP-16、VM-26 等抗癌药的原料^[2]。

收稿日期: 2004-05-10

基金项目: 省科技厅计划项目 (2004C32064)。

作者简介: 潘琦 (1978—), 女, 浙江湖州人, 硕士研究生, 从事植物组织培养与植物化学分析研究。Tel: 021-62208660-3271; E-mail: pqwhite2001@yahoo.com.cn.

通讯作者: 傅承新, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事植物分类和系统进化研究。Tel: 0571-87971576; E-mail: biosys@zju.edu.cn.

由于人们多年过度采挖及生殖机制的限制^[3~5],八角莲野外分布的地区和数量锐减,资源濒于灭绝,难以满足医药领域的需要^[6].现已列入《中国珍稀濒危植物名录》(第一批)加以保护^[7].本研究旨在对国产八角莲的分布、生境、遗传多样性、濒危现状及保护、快速繁殖、有效成分及利用进行全面的研究,为持续开发利用该植物打下科学基础.本文是其中的部分研究结果,对产自峨眉山八角莲的野生品种在本校植物园栽培的植株,及其组织培养材料进行了药用有效成分含量的比较研究.

1 仪器与材料

1.1 仪 器

Waters 高效液相色谱仪,包括 Waters 2690 液相色谱仪, Waters 2487 紫外可见检测器.

1.2 试 剂

甲醇(色谱纯),其他试剂均为分析纯.

1.3 色谱条件

色谱柱: Waters C18 (4.6 mm × 250 mm); 流动相: 甲醇: 水 (50: 50); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 40 °C; 进样量: 5.0 μL; 检出限为 1 ng.

1.4 材 料

野生八角莲根于 2000 年采自峨眉山,经浙江大学丁炳扬教授鉴定后,种植于浙江大学植物园八角莲试验地;其组织培养原材料取自上述移植个体,由本课题组在 2001~2002 年期间培养后提供.标本存于浙江大学标本室(HZU).愈伤组织从野生八角莲叶片诱导而得;组培根由愈伤组织分化获得.鬼臼毒素标准样品(熔点: 114~116 °C,白色晶体)由本实验室提供.

2 实验方法与结果

2.1 组培品的制备

2.1.1 愈伤组织 取野生八角莲幼叶叶片 (0.5 cm × 0.5 cm) 为外植体,消毒后接入培养基中培养形成愈伤组织.再取该愈伤组织在含 2,4-D 和 BA 的 MS 培养基上继代培养 2 个月,获得愈伤组织样品.

2.1.2 组培根 由愈伤组织在含 NAA 和 BA 的 MS 培养基上进行分化培养后获得.

2.2 标准液的制备

精密称取经重结晶的鬼臼毒素标准品适量,用色谱纯甲醇溶解并稀释至浓度为 1.50 mg · mL⁻¹,作为标准液.

2.3 样品液的制备

取一定量野生八角莲根茎、组培的八角莲愈伤组织和组培获得的八角莲根茎在 60 °C 下烘干至恒重.精密称各 2.0000 g,分别用 95% 乙醇 50 mL 回流 3 次,每次 2 h.合并提取液,减压浓缩至残留物至浆状,倒入 15 mL 水中,捏揉,得黄色沉淀.过滤,固体自然干燥,然后溶于氯仿中,过滤,滤液蒸干,得黄色固体,为木脂素混合物.精密称取一定量的该固体,置 10 mL 容量瓶中,用甲醇(色谱纯)稀释至刻度,溶解摇匀,样品浓度均为 1.50 mg · mL⁻¹,即为用以测定鬼臼毒素的试样.

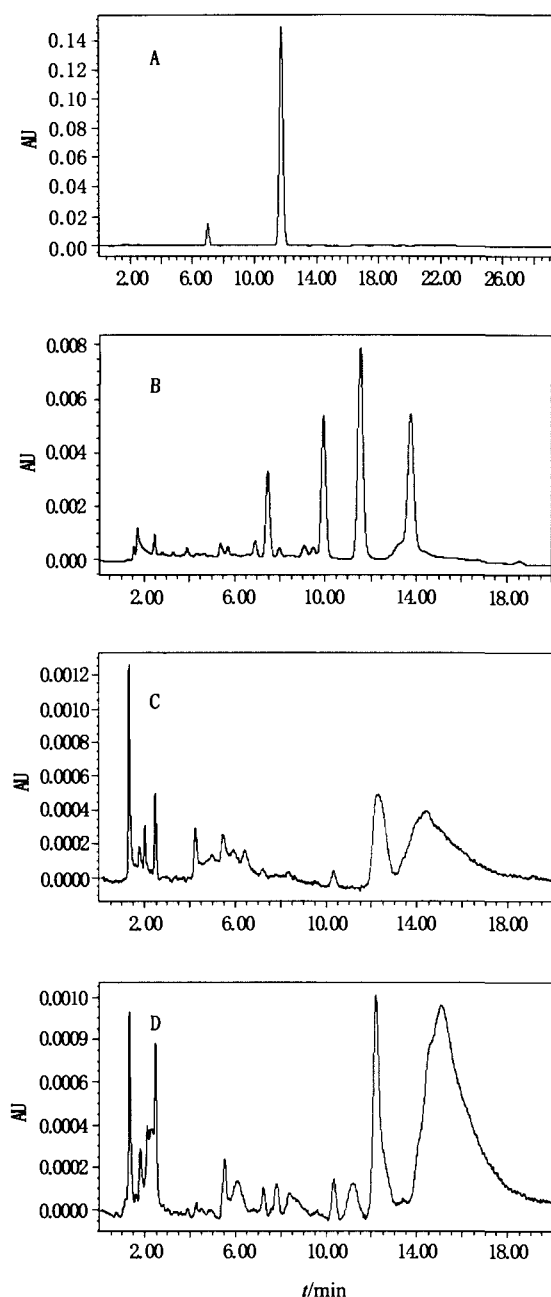
2.4 含量测定

含量测定用外标法进行.根据标准样品迭加和保留时间鉴定峰形,样品溶液经 HPLC 分离后,记录峰面积,计算木脂素测定溶液中的鬼臼毒素浓度,再由样品中的木脂素含量,算得各样品中鬼臼毒素的含量.用上述方法得到的结果见表 1 和图 1.

表 1 八角莲野生品与组培品的愈伤组织和根的鬼臼毒素含量的比较

Table 1 Comparison of podophyllotoxin content between calli, induced roots and the roots of the *Dysosma versipellis*

样品名.	样品浓度每毫升 相当于生药克数/g	LC 法测定鬼臼 值/(mg · mL ⁻¹)	每克生药含 鬼臼量/mg
野生品	0.0230	1.3818	60.0
愈伤组织	0.0440	0.5154	11.7
组培根	0.0296	0.6587	14.8



A-鬼臼毒素标准品; B-八角莲野生品;
C-愈伤组织; D-组培根组织。

图1 八角莲组培品和野生品 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of podophyllotoxin extracted from callus tissue and root of *Dysosma versipellis*

3 结果与讨论

本实验结果表明,愈伤组织生长2个月就能达到野生八角莲鬼臼毒素含量的20%,而组

培根的鬼臼毒素含量可达25%。栽培条件下八角莲的生长周期太长,从种子萌发到生长成株需5~8年,加上自身生殖机制的限制和所处生境受到人为破坏,使八角莲的野外分布地区和资源锐减,亟待保护。组织培养过程中,细胞生长速度要比植物正常生长速度快,接近于分生组织的生长速度,而且具有不受地区、季节和气候限制等优势,因此通过组织培养可克服野生八角莲生长缓慢,生态分布区域局限,数量少,繁殖力低的缺点。

经HPLC分析,八角莲愈伤组织和分化的根中均含有鬼臼毒素(分别为0.117%和0.148%),但含量低于野生品含量(0.600%)。愈伤组织细胞往往缺少特定组织或器官,使得其次生代谢产物表达不够,因此代谢产物浓度通常比较低^[11]。而组培根中鬼臼毒素含量低于野生品,可能是由于培养过程中,细胞内外条件的改变而导致控制次生代谢产物合成的基因差异性表达所致。另外,生态环境如气候、土壤、地形和生长周期等对药用植物的有效成分的积累也有较大的影响^[8~11]。

文献报道在培养基中添加鬼臼毒素的前体合成物质如苯丙氨酸或诱导子如鬼臼类多糖物质等均可提高愈伤组织中鬼臼毒素的产量^[12]。另外,利用发根农杆菌诱导药用植物的组织形成毛状根,可成倍增加植物中次生代谢产物的含量^[13]。基于这些报道,我们考虑使用相关技术提高组培八角莲中有效成分的含量,进一步的研究正在进行中。

References:

- [1] YING Jun-sheng(应俊生). *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*(中国植物志)[M]. Beijing: Since Press, 2002. 29: 258-260. (in Chinese)
- [2] CHEN Yun-heng(陈毓亨). A study on the resources of Chinese odophyllin plants [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*(药学报), 1979, 14(2): 101-106. (in Chinese)
- [3] MA Shao-bin(马绍宾). A Contribution to the geographical distribution and phylogeny of podophylloideae [J]. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究), 1997, 19(1): 48-56. (in Chinese)
- [4] HUANG Heng-yu(黄衡宇). The Genesis of microspore and the formation of mail gametophyte in

- Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng [J]. **Bulletin of Botanical Research** (植物研究), 2001, 21(4): 562-566. (in Chinese)
- [5] MA Shao-bin(马绍宾). A karyotypic study on podophylloideae (Berberidaceae) [J]. **Acta Botanica Yunnanica** (云南植物研究), 1996, 18(3): 325-330. (in Chinese)
- [6] YU Pei-zhong(俞培忠). Separation and determination of podophyllotoxin in *Diphylleia sinensis* L [J]. **Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis**(药物分析杂志), 1999, 19(1): 35-37. (in Chinese)
- [7] FU Li-guo(傅立国). **Rare and Dangered Species in China Chinese Plants** (中国珍稀濒危植物) [M]. Shanghai: Shanghai Education Press, 1989, 85-86. (in Chinese)
- [8] WU Jing-zhong(吴锦忠). Analysis and compare of podophyllotoxin in calli induced from *Prunus Persica* Batsch [J]. **China Journal of Chinese Materia Media**(中国中药杂志), 2000, 25(11): 660-662. (in Chinese)
- [9] LIU Chun-cha(刘春朝). The study on the second metabolites by tissue culture [J]. **Biotechnology Bulletin** (生物技术通报), 1997, 3(5): 1-7. (in Chinese)
- [10] XU Song-fen(徐颂芬). The Ecological Facts Effect to the Medical Plants [J]. **Chinese Traditional and Herbal Drug**(中草药), 1989, 12(11): 47-48. (in Chinese)
- [11] WANG Dong(王东). Variation of alkaloid contents in calli culture of *Berberis pruinosa* [J]. **Journal of Yunnan University**(云南大学学报), 2002, 22(3): 225-226. (in Chinese)
- [12] Toshio Muranaka, Masaru Miyata, Kazutaka Ito. Production of podophyllotoxin in *Juniperus chinensis* callus culture treated with oligosaccharids and biogenetic precursor [J]. **Phytochemistry**, 1998, 49(2): 491-496.
- [13] Inomata S, Yokoyama M, Gogu Y, et al. Growth pattern and ginsenoside production of agrobacterium transformed panax ginseng roots [J]. **Plant Cell Rep.** 1993, 12: 681.

澳大利亚西澳州政府农业部副部长 Rob Delane 先生访问我校农学院

2005年11月28日上午,澳大利亚西澳州政府农业部副部长 Rob Delane 先生,在西澳州农业部资深研究员李承道博士、西澳州政府贸易投资促进会杭州代表处王晓立高级商务经理陪同下,专程访问了我校农学院。农学院常务副院长张国平教授主持接待了来宾,农学院副院长周雪平教授、作物研究所副所长周伟军教授分别介绍了农学院作物所的科研、教学及社会服务等近况,Delane 先生介绍了澳大利亚及西澳州农业发展的有关情况,双方在大麦育种和生理研究以及相关领域开展合作研究与研究生培养等方面进行了很好的交流,并达成了共识。

28日下午,副校长朱军教授接见了 Delane 先生一行,对外交流与合作处处长丁建民教授、科研处副处长陈昆松教授分别介绍了学校对外交流、科研等工作,Delane 先生表示非常高兴来我校访问,并愿意加强与我校的进一步交流合作。访问期间,朱军副校长和 Delane 副部长分别代表我校和西澳州政府农业部签署了有关大麦育种和生理研究及相关领域的合作协议书。

——浙江大学 农学院