

生物技术在我国药用植物中的应用及其研究进展

罗 辉, 周三牛

(井冈山学院 医学院, 江西 吉安 343009)

[摘要] 本文综述了近年来生物技术在我国药用植物研究中的应用进展, 包括组织培养技术在药用植物中的应用; 植物组织、细胞培养生产次生代谢产物的研究概况; DNA 分子标记技术在药用植物中的应用等, 并提出了该研究领域的发展方向。

[关键词] 药用植物; 生物技术; 组织培养; 转基因植物; 中草药鉴定

[中图分类号] Q949.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-2735 (2007) 05-0051-04

前言

药用植物在我国传统医学中具有重要地位。目前我国药用植物有 11118 种 (含 1208 个种以下单位), 市售中成药中, 从植物中提取的药物或经半合成的药物占商品的 20%^[1]。近 10 年来, 从天然产物中寻找新的生理活性成分或先导化合物以开发新药已成为全球关注和研究的热点。生物技术以工程手段增加数量或提高品质, 从而满足人类对生物制品日益增长的需求。生物技术的兴起, 为我国药用植物的研究和发展提供了良机 and 手段^[2]。

中草药的用量日趋广泛和增长。天然药物的收获正促使很多药用植物遗传多样性和环境栖息的丢失, 利用家庭型培养, 能够给草药提供机会去克服一些问题: 真伪的鉴别、遗传与表型的变异, 提取物的利用率及稳定性、毒性成分及污染物等; 在生物活性物质和毒素方面, 使用受调控的环境能克服培养困难以及这些也是种操作表型变异的好方法^[3]。传统的培育植物方法既能改善农学与药学特征, 以及分子标记筛选也是使用的越来越多。在组织培养和遗传信息去改变靶代谢物生物途径方面, 有了很大的进步^[4]。既然中草药在人类疾病的预防和治疗以及天然药物筛选中占有重要地位, 随着科学技术的进步, 生物技术在中药现代研究中也展示出良好的应用前景^[5]。

1 组织培养技术在药用植物中的应用研究

1.1 药用植物种苗的快速繁殖

在植物生物技术领域里, 植物快速繁殖技术在生产应用上已发挥巨大的优势。在我国试管苗年产量上千万株, 使一些农作物、林木优良品种的种植面

积每年以上万亩的速度迅速扩大, 如香蕉、甘蔗、桉树等试管苗种植。药用植物, 特别是对于那些珍贵稀有、濒临灭绝、发现新疗效、医疗效果好、常规繁殖困难、市场需求量大而一直供不应求的药用植物而言, 植物快速繁殖技术更显示出巨大的优越性。广西特产的道地药材品种罗汉果, 用常规的压条繁殖方法, 一根藤条年可压出 1~4 个种薯, 但采用试管苗繁殖技术, 一个芽年可繁殖达 6 万株试管苗, 极大地提高了优良种苗的繁殖数量。从 2003 年开始, 罗汉果种苗工厂化生产后, 年产试管苗 500 万~600 万株; 种植面积 2005 年超过 5 万亩, 亩产果量达到 7000~10000 个。药用植物快速繁殖技术经几十年的研究, 已有铁皮石斛、金线莲、苦丁茶、罗汉果、青天葵、广豆根、甜茶、霍山石斛、番红花、人参、贝母、地黄等几百种植物获得试管苗, 并应用于生产。试管苗具有繁殖系数高、去病毒的特点, 生产不受季节限制, 可工厂化生产等, 这将使药用植物快速繁殖技术在药材规范化种植中发挥巨大作用。

1.2 药用植物细胞大量培养

药用植物在生长发育过程中, 体内不同器官或组织中的细胞, 积累有对其生存不起基本作用但具有药用功能的多种化合物, 这些化合物不但能用于防治疾病, 而且是开发新药物的重要来源。几千年来药用植物的全株或是植株的根、茎、叶、花、果、种子等部分被直接作为药品或药材原料加以使用, 但从 20 世纪初植物组织和细胞培养技术发展起来后, 人们发现离体培养的植物细胞具有合成与其母体植物同样成分的化合物的能力。

植物的各种组织, 如维管束形成层、贮藏器官的薄壁组织、根的中柱鞘、胚乳、子叶、叶片的叶肉、维管束组织等, 在适合的条件下, 都能诱导产生愈伤组

织,而且愈伤组织或从中分离出来的细胞能不断增殖继代培养。由此通过培养药用植物细胞,产生所需药用化合物的研究。如从三角叶薯蓣的培养细胞中产生薯蓣皂甙用于避孕;金鸡纳细胞培养物产生奎宁用于抗疟疾;红豆杉细胞培养物产生紫杉醇用于抗癌;其他有人参、紫草、长春花、罂粟、颠茄、印度萝芙木、天仙子、毛地黄、曼陀罗、三分三、田七等植物细胞培养物产生各种与原植物成分基本一致且同样具有生理活性的化合物。在药用植物的细胞培养中,培养细胞经高含株系筛选后,再用于大量培养,其合成某些特定药物的产量相当或超过从完整植株所得到的产量。长春花细胞培养物中的西萝芙木碱和蛇根碱含量是1.3%(干重),植株的含量是0.26%(干重);三角叶薯蓣植株每克块根含20mg(干重)薯蓣皂甙,而其每克细胞培养物中薯蓣皂甙的含量是26mg(干重)。

进行药用植物的人工栽培是保证中药资源的一个有力手段,目前我国种植的大宗中药材达150余种。已运用杂交、诱变、多倍体、试管受精、原生质融合、花药培养等生物学技术获得浙贝母、元胡、地黄、枸杞、乌头、虫草等高产优质的新品种。重组DNA技术已可将动物、植物、微生物的基因相互转移,使药用植物资源再生、创新成为可行。

1.3 药用植物的品种改良

生物技术能在细胞水平上进行诱导和筛选,增大了遗传变异的资源;重组DNA技术和细胞杂交可增加、除去或修饰植物的某个基因,使有利基因按计划理想地组合;用花药培养或未授粉的子房培养,获得单倍体或纯合二倍体,极大地提高了选择优良基因型的效益,并可加速获得遗传性状稳定而一致的群体,通过原生质体诱导融合,还得到一些生物碱或次生代谢产物含量高的药用植物,例如曼陀罗属有一个种间细胞杂种,其生物碱含量可高于亲本20%~25%。目前我国从药用植物的原生质体培养和花药培养中获得完整植株的品种有前胡、防风、决明子、党参、石刁柏、枸杞、毛叶曼陀罗等。

植物基因工程已成功地将外源基因导入植物体中,并获得转基因植物新品种。从1983年国际上首次获得转基因烟草、马铃薯以来,世界上已获得转基因植物达100余种。利用这一技术可将某些优良性状基因导入本不具备这些性状的植物体内,可在到改良植物品种的目的。如抗病、抗虫等基因的导入,获得抗病虫植株;控制植物次生代谢产物合成酶的合成基因的导入,获得有效成分含量高的植株等^[6]。采用生物技术进行药用植物的品种改良,在细胞水

平上进行各种遗传操作,不但改良了植物的某些性状,同时也使育种周期缩短,减少土地的利用,节省人力和物力,在生产和应用上有巨大的潜力。

1.4 药用植物离体种质保存

用生物技术进行药用植物种质保存有两种方法:一种是以抑制细胞生长来保存种质,另一种是超低温的种质保存。用抑制细胞生长的方式来保存,其主要手段是控制培养物的培养基成分及培养温度。在培养基中加入脱落酸等生长减速剂或提高细胞激动素、赤霉素的浓度,减缓培养物的生长速度,使继代周期延长,继代次数减少,以保存种质。降低培养温度,使培养物的分化代谢活动减弱,加长继代周期,也是种质保存的可行办法。如葡萄茎尖在9℃条件下保存,每年继代培养1次,就能保持茎尖的分生能力。超低温的种质保存是将药用植物细胞或组织保存在-196℃的液氮中,让细胞的代谢活动完全停止,但同时还保持细胞的生命力和再生能力的一种种质长期保存方法。药用植物种质的超低温保存研究,在我国近十年才开始,目前已有铁皮石斛、新疆紫草、浙贝母超低温保存研究的报道。

采用植物细胞、组织或器官,能最大限度地抑制生理代谢强度,降低劣变发生频率,达到长期保存种质的目的。铁皮石斛试管苗在4℃黑暗条件下可连续保存12个月,并能恢复正常生长^[7]。杜仲的花粉在液氮(-196℃)中保存良好,并实现了花粉粒的萌发。刘贤旺等在研究凹叶厚朴愈伤组织的超低温保存中发现适宜的保存材料、恰当的处理、较好的冷冻保护剂以及合适的冷冻程度是超低温保存凹叶厚朴愈伤组织的关键。而李明军等^[8]利用怀山药的无菌苗进行离体诱导,形成微型块茎,发现微型块茎是怀山药离体繁殖和种质保存的又一途径,这将有助于种质资源的保存和交流。目前离体种质保存虽已进行了较长时间的研究,但因其本身的局限性或技术上的不成熟而在实际应用中受到极大限制。而超低温保存却显示了其广阔前景,但长期使用冻存材料可使其再生能力衰退、组织培养后代遗传稳定性等仍未解决的问题还有待于进一步研究。

2 药用植物次生代谢产物的研究

2.1 利用植物组织、细胞培养生产次生代谢产物

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细胞培养的发酵罐,人们已对包括紫草、长春花、毛地黄、黄连等在内的多种药用植物细胞进行大规模生产实验,有的已成商品投入市场。为了加速植物细胞培养技术商业化生产进程,各

国科学家们一方面不断改进培养技术,如控制培养的气相环境,加入刺激剂,加入大孔树脂吸附剂等;一方面发展新的培养方法,如高密度培养、连续培养和固定化培养等,以期得到一种适合于植物细胞工业生产的培养方法。随着研究的不断发展,植物细胞大规模培养成为一种成熟的工业化生产方式已经为期不远了^[9]。同时,代谢产物生物合成的基础研究越来越受到重视,特别是有关酶的确定和分离,不仅为控制代谢途径提供了科学依据,而且为利用基因工程手段操纵代谢途径打下了重要基础。

目前用于以次生代谢产物生产为目的的组织培养和细胞培养的药用植物已有许多种。从细胞培养物中分离得到的有用物质有:酶类(α -淀粉酶、淀粉酶、蛋白水解酶、过氧化氢酶、酸性磷酸化酶、 β -糖苷酶、IAA 氧化酶、细胞色素氧化酶等);生物碱(莨菪生物碱、利血平、吲哚生物碱、麦角碱等);甾体(地奥甾元、山萘皂甾元、育亨皂甾元等);萜类(角鲨烯、羊毛甾醇、环阿屯醇、人参三醇、人参二醇、油烷酸、人参甾等);色素等。1964 年,罗士韦等首先成功地进行了人参的组织培养^[10],随后我国和其他国家的一些学者将人参的组织培养过渡到工业化生产。目前我国学者已经建立了长春花、人参、丹参、三七、三尖杉、忍冬、红花、黄连、西洋参等几十种药用植物的液体培养系统,并实现了人参的 10L 体积的大规模培养。

2.2 发状根培养生产次生代谢产物

由发根农杆菌及其 Ri 质粒转化产生的发状根比较容易再生出新植株,而且很多植物的发状根在离体培养条件下都表现出原植株次生代谢产物的合成能力,因此,发状根培养又被称为转基因器官培养,是一条利用生物技术生产次生代谢产物的新的有效途径,很适用于有价值的次生代谢产物的生产。目前国内学者将发根培养技术应用于药用植物方面的研究,先后成功地对绞股蓝、甘草、丹参等 24 种药用植物进行发状根诱导,应用到的菌株有 R1600、ATCC15834、LBA9402、TR105、R1000 和 Rri2659 等,得到的次生代谢产物有生物碱类(莨菪生物碱、吲哚类生物碱、喹啉类生物碱等)、苷类(人参皂苷、甜菜苷等)、黄酮类、醌类(紫草宁等)以及蛋白质(天花粉蛋白等)。

毛状根生长迅速,遗传性稳定和生化特性不易改变的特点,越来越受到人们的重视。这一培养系统对传统药材来讲更为重要。因为约三分之一的传统药材是植物的根部。目前已在长春花、烟草、紫草、人参、曼陀罗、颠茄、丹参、黄花、甘草和青蒿等四十多

种植物中建立了毛状根培养系统^[11]。大规模培养使用的发酵罐有多种类型,其中以气升式效果为佳。在提高毛状根中次生物质数量的研究中,发展了培养基连续流动、双液相发酵等新的培养技术;利用大孔树脂做为吸附剂的培养方法也有报道。

3 基因工程和 DAN 分子标记技术在药用植物研究中的应用

3.1 转基因药用植物研究

目前植物转基因的方法主要有农杆菌介导的基因转移、种质系统的基因转移和外源基因直接导入法等。国内学者主要采用农杆菌介导的基因转移法。人工改造过的农杆菌 Ti 质粒或 Ri 质粒是一种很好的植物基因工程载体,同时 Ti 质粒或 Ri 质粒还可以配合使用,建立二元载体系统,有利于质粒在植物基因工程中的应用。王慧中等已成功地将外源卡那霉素抗性基因通过根癌农杆菌介导的基因转移技术导入了宁夏枸杞的幼茎外植体^[12],所获得的再生植株经胭脂碱检测、NPN-Ⅱ活性测定及 Southern 分子杂交,证明外源基因 NPN-Ⅱ及胭脂碱合成酶基因,已整合到枸杞细胞的核基因组上,并能在植株水平上表达出相应的性状。雷和田等用根癌农杆菌感染栝楼无茵苗后,形成栝楼冠瘿组织,将其作为培养系统生产无花粉蛋白有很好的开发前景^[13]。此外,我国学者应用农杆菌感染枳壳、丹参、桔梗、甘草等药用植物的研究也取得了一定的进展,其中已得到部分植物的合理转化体系。目前我国将转基因技术应用于药用植物主要在改进植物品质及适应性、抗虫和抗病毒、抗除草剂、生产药用有效成分等几个方面开展工作,其中某些领域已取得明显进展。

目前,转基因药用植物器官和组织的研究文献报道较多^[14],已有青蒿、黄芪、丹参、红豆杉、决明、大黄、栝楼等 10 多种药用植物转化的器官——发状根诱导成功,并建立起了它们的培养系统。对青蒿、黄芪、丹参的发状根培养研究已经相当深入,进入了大规模培养的水平,不仅进行了有效成分的研究,而且部分还进行了药理作用试验。对青蒿的研究还克隆出了有效成分生物合成途径中的关键酶基因。

3.2 DNA 分子标记技术在药用植物研究上的应用

分子标记技术作为现代分子生物学的重要组成部分,从广义上讲也属生物技术范畴。DNA 药分子标记技术在药用植物研究上的应用主要有以下三方面内容。

3.2.1 药用植物生物多样性保护与可持续利用研究

我国是世界上药用植物资源最丰富的国家之一,已查明的药用植物有 11,118 万余种(含 1208 个种以下单位),随着生态环境的破坏,珍稀濒危植物不断增加,加之药用植物需求量的增大,资源问题将更加突出。因而,对药用植物的多样性的保护受到国内外普遍关注。保护药用植物生物多样性,应围绕挽救、研究及合理利用三个环节。在传统药用植物资源研究与保护方法基础上,运用分子标记技术结合计算机手段,从本质上揭示物种遗传变异及其演化规律,建立重要药用植物基因库,研究在自然或人工控制下个体更新速度及规律。从而制定相应的管理措施,实现药用植物资源研究与袋子保护的科学化、现代化、促进资源的可持续利用^[15]。

3.2.2 中药材的鉴定及道地性研究 中草药的基原鉴定是中草药研究工作的基础和关键,但目前在品种研究中主要还是应用形态、细胞组织、化学成分等特征,这些特征在受遗传因素影响的同时,还受外界因素和生物体发育阶段及器官组织差异的影响。中药材多为干品,许多活性成分(酶、蛋白质等)失活或损失,给传统鉴定方法带来困难。由于 PCR 技术能将原来痕量的 DNA 扩增到足以进行分析与检测的数量,而且具产物专一性强,不需特殊纯化等优点,使 DNA 分子标记方法特别适于目前生药学方法难以鉴定的一些多来源中药材,贵重药材及其伪品等^[16]。如 RAPD 技术已成功用于人参、西洋参、山麦冬、地胆草等的鉴定。通过道地药材与非道地药材的比较研究,明确同种药材优质品种及其最佳生长条件。众多实验已阐明,同种药材不同产地,质量可能差异很大。其本质是其物质基础——化学成分的种类或含量的差异。化学成分的差异可能是由遗传因子产生的,也可能是地理-生态因子(生境)形成的,还可能由其它因素如传媒等产生,各种因素对道地药材形成的作用是不一致的。因而应用分子标记技术对常用的、著名的药材与非道地药材进行系统比较研究,明确同一药材的优质物种及其最佳生长条件,可为中药材的栽培提供科学依据。

3.2.3 药用植物亲缘关系和分类学研究 目前药用植物亲缘关系研究中,主要应用形态、细胞组织、化学成分等特征。这些特征在受遗传因素影响的同时,还受环境因素的影响,具有一定的局限性^[17]。同时,随着药用植物资源及分类鉴定研究的不断深入,新种不断发现,应用经典的形态分类方法,常有异义,分类地位经常变动,给正本清源及一系列的研究带来困难。DNA 分子作为遗传信息的直接载体,不受外界因素和生物体发育阶段和器官组织差异的影

响,每一个体的任一体细胞均含有相同的遗传信息,通过选择合适的 DNA 分子标记方法,可准确鉴定物种及品种间的遗传差异,从而揭示物种的亲缘关系,为物种鉴定及这研究提供依据。

4 小结

生物技术在中药现代化中有广阔的应用前景,其中细胞培养工程技术已在中药材的保存与育种、有效成分的发酵、分子标记在药材的质量甄别中得到应用。在中药作用机制的研究上,已经采用生物化学、生理学和分子生物学技术、检测了中药作用的个别基因或蛋白质的变化。中药应该与生物技术密切结合,使生物技术成为中药研发的必备工具,可以预见,随着生物技术在中药现代化中广泛应用和深入研究,可望为现代中药研究提供良好的手段和方法。

目前国际上药用植物的研究主要集中在药用次生代谢产物的大规模工业化生产、利用转基因植物生产药物、中药材的分子生物学鉴定等领域^[18]。如国外已有几十种药用蛋白质或多肽在植物中得到成功表达,其中包括人的细胞因子、表皮生长因子、促红细胞生成素、干扰素、生长激素、单克隆抗体和可作为疫苗的抗原蛋白等,其中有些药物已实现商业化生产^[18]。虽然我国药用植物的研究已取得了相当大的进步,但与国外先进水平相比还有一定的差距,还有待更深入的研究。

参考文献

- [1]赵寿经.生物技术在药用植物中的应用[J].特产研究,1999,(2):56-59.
- [2]梁文裕,曹雯,等.生物技术在药用植物研究中的应用[J].宁夏农学院学报,2003,24(4):92-97.
- [3]Peter H. Canter, Howard Thomas and Edzard Ernst. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology[J]. TRENDS in Biotechnology, 2005,4(23):512-520.
- [4]戴均贵,朱蔚华,吴蕴祺,等.发根培养技术在植物次生代谢产物生产中的应用[J].植物生理学通讯,1999,(1):69.
- [5]杜日文,金若敏,吴耀平,等.大规模培养的黄芪毛状根急性毒性研究[J].中草药,1999,(6):444-448.
- [6]肖培根.面向 21 世纪中草药研究中的几个热点[J].中国药学杂志,1997,32(11):671-674.
- [7]史永忠,潘瑞炽,王小青,等.铁皮石斛种质资源的低温保存[J].应用与环境学报,2000,6(4):326-330.
- [8]李明军,刘萍,张嘉宝.怀山药微型快茎的离体诱导[J].植物生理学通讯,2000,36(1):41-42.
- [9]徐国钧.21 世纪生药研究展望[J].中国药学杂志,1997,32(9):513-517.
- [10]中国科学院上海植物生理研究所细胞室.植物组织和细胞培养[M].上海:上海科学技术出版社,1978.305-316.
- [11]刘泳.生物技术在传统药材生产中的应用前景[J].生物工程进展,1997,17(2):60-62.

Study on the chinese endemic genera of spermatophyte distributed in jinggangshan

DENG Xian-lan, LONG Wan-wan, OUYANG An-hua, GUO Zhi-you

(Department of Life Science, Jinggangshan University, Ji'an 343009 China)

Abstract: This paper deals with the study on Chinese endemic genera of seed plants distributed in Jinggangshan. The results are summarized as follows: There are 33 endemic genera of seed plants in China in Jinggangshan, belong to 28 families and 34 species. The percentage number of genera about 13.6% in China and about 58.9% in Jiangxi. Among them 18 genera are of monotypic, 7 genera are of oligotypic and 8 genera are of polytypic. The characteristics of Chinese endemic genera of seed plants in Jinggangshan can be concluded as that: it has a large proportion of monotypic and majority of woody plants, evident nature of temperate, and is ancient in origin, obviously rare and endangered. Compared with the Chinese endemic genera of seed plants among Jinggangshan and neighbouring area is Jiulingmufushan > Jinggangshan > Wuyishan > Jiulianshan > Sanqingshan.

Key words: endemic genera to China; spermatophyte; Jinggangshan

(责任编辑:彭晓冬)

(上接第54页)

- [12]王慧中,黄发灿,李安生,等.枸杞转基因植株的再生[J].生物工程学报,1991,7(3):230-223.
- [13]雷和田,宋经元,祁建军,等.根瘤农杆菌以枯楼的遗传转化[J].云南植物研究,2001,23(1):67-71.
- [14]戴均贵,果德安.现代中药生物技术研究展论[J].世界科学技术——中药现代化,2000,2(5):27-33.
- [15]Mizukami H, Shimizu R, Kohda H. Restriction fragment length polymorphisms of rDNA and variation of essential oil composition in *Atractylodes* plants [J]. Biol pharm Bull, 1996, (19):577.

- [16]Cheng K T, Su C H, Chang H C. Differentiation of genuine and counterfeit of *Cordyceps* species using random amplified polymorphic DNA [J]. Planta Medicinal, 1998, (64):251.
- [17]殷帅文,刘昱生,刘南.井冈山民间可用药用蕨类植物研究及展望[J].井冈山学院学报,2007,28(4):40-42.
- [18]刘德虎.利用转基因植物生产药用蛋白[J].生物技术通报,1999,3(4):1.
- [19]林美珍.甜叶菊的生药鉴定[J].井冈山学院学报,2006,27(8):51-52.

Development and research of biological technology on Chinese medicinal plant

LUO Hui, ZHOU San-niu

(The Medical College of Jinggangshan University, Ji'an 343009, China)

Abstract: This paper summarized the recent advances in biological technology research on Chinese medicinal plant including tissue culture, secondary the metabolites the utilization of genetic engineering and the molecular biology technology on Chinese medicinal plant were reviewed. It is a sign of biological technology that DNA recombination and DNA molecular markers technology, and the perspective research of the fields in the future were also discussed.

Key words: medicinal plant; biological technology; tissue culture; transgenic plants; Chinese herbs identification.

(责任编辑:罗辉)