

药用植物的组织培养的应用

陈文武, 彭兰华

(徐州生物工程高等职业学校, 江苏 徐州 221006)

摘要: 阐述了药用植物组织培养的优点、研究进展及主要应用。

关键词: 药用植物; 组织培养; 主要应用

植物是药物的重要来源之一, 人类利用药用植物的历史源远流长。今天, 尽管科学家已经能够利用化学方法研制品类繁多的药品, 但开发利用植物药的热情在世界范围内却有增无减。这主要是由于植物种类丰富, 体内所含的有效成分形形色色, 具有开发新药的巨大潜力; 既可以从中直接发现新药源, 又可以发现新的先导化合物, 通过结构修饰等技术发明新药。中国野生药用植物种质资源非常丰富, 据统计在 5 000 种以上, 但传统的中草药获取方法是以采集和消耗大量的野生植物资源为代价的, 当采集和消耗量超过自然资源的再生能力时, 必然会导致物种濒危甚至灭绝。再有, 自然生态环境的日益恶化, 也进一步导致药用植物资源的匮乏。在已出版的《中国植物红皮书》第一卷中, 共收录了 388 种国产珍稀濒危野生植物, 其中有药用价值的约 100 余种, 在中国历史上就已赫赫有名的人参、天麻、黄连、黄芪、杜仲、厚朴、巴戟天、平贝母、肉苁蓉等, 均位列其中。迄今, 为了解决药用植物的供需矛盾, 人们多采用人工栽培的方法扩大药源。但在人工栽培的药用植物中, 有不少名贵药材如人参、黄连等生产周期很长, 如果以常规方法育种或育苗, 需要花费很长时间。另有一些药用植物如贝母、番红花等, 因繁殖系数小、耗种量大, 导致发展速度很慢且生产成本增加。还有一些药用植物, 如地黄、太子参等, 则因病毒危害导致退化, 严重影响了产量和品质。于是, 积极研究药用植物资源的再生技术, 使有限的资源为人类永续利用迫在眉睫。因此利用组织培养手段快速繁殖药用植物种苗, 或者利用组织培养或细胞培养手段直接生产药物便随之日益发展。

1 药用植物的组织培养的优点

(1) 四季均可生产, 不受地区、季节及有害生物的影响。

(2) 占地面积少, 便于工厂化生产, 可对细胞生长自动控制和代谢过程合理调节。

(3) 便于筛选高产细胞株。

(4) 利于生物转化, 寻找新的有效药物成分。植物细胞内存在羟基化酶、氧化酶、还原酶、甲基化酶、酯化酶、糖基转移酶、糖苷酶等多种酶, 植物培养物作为一种生物反应器转化外源化合物, 能够产生原植物所没有的, 甚至是至今自然界尚未发现的化合物。

(5) 个体差异小, 生产周期短, 设备简单, 能节省人力、物力等。

(6) 利用组织培养过程中出现的芽变或人工诱变, 或进行脱毒, 培育新品种, 提高药用植物品质。

(7) 保存种质资源。

2 药用植物的组织培养产生的药物

药用植物组织培养能产生很多种药物, 主要有苷类、生物碱、固醇类、醌类、黄酮类、蛋白质及其它生理活性物质。

3 药用植物的组织培养的研究进展

3.1 通过组织培养成功的药用植物至少有 200 种

培养的药用植物从常见的到珍稀濒危植物、民族植物, 如云南黑节草、延龄草、高山红景天, 藏药—川西獐芽菜、莪术、水母雪莲、星花乡线菊、溪黄草、玉叶金花、辽东葱木等。从生产常用药的植物到具有抗癌、抗病毒等有效成分的植物, 如红豆杉、艾黄杨、狼毒、大戟属、长春花、米仔兰、狗牙花和香榧等。培养用的材料也有提高。开始以草木、

木本或藤本植物的根、茎、叶、花、胚、果实、种子、髓、花药等组织或器官进行培养,发展到从器官诱导到愈伤组织、冠瘿组织、毛状根进行培养,再发展为细胞培养。目前还借助植物基因工程技术通过农杆菌介导的转化获得基因药用植物,利用转基因组织和器官培养生产药用成分。

3.2 我国的药用植物的组织培养研究

我国的药用植物组织培养研究,可以追溯到20世纪50年代。1964年,罗士韦教授等首先报道了人参组织培养获得成功的研究成果。1983年,全国第一届药用植物组织培养讨论会召开,当时全国已有30多个单位,100余人从事药用植物的组织培养研究。其中以广西药物所的罗汉果快速繁殖,山东大学生物系与菏泽地区中药材试验站的怀地黄去病毒研究和药科大学人参工业化生产的中间试验为代表性的研究成果。自此,我国药用植物的组培研究迅速发展。1986年,由我国科学工作者编写的有关专著《药用植物组织培养》问世。到目前为止,我国的科技工作者在药用植物组织培养方面已取得了巨大的成绩,组织培养技术水平也在不断进步:如培养方法已从固体、液体、悬浮培养,深层大罐发酵发展到液体连续培养;培养材料也从药用植物的根、茎、叶、花、胚、果实、种子等组织或器官,这些器官诱导出的愈伤组织或冠瘿组织,一直发展到目前的细胞。近40a来我国经离体培养获得试管植株的药用植物已有金线莲、白芨、番红花、铁皮石斛、绞股蓝、苦丁茶、南洋金花海巴戟等100余种,其中大多数为珍贵的药用植物。从20世纪60年代开始的我国传统药材离体培养和试管繁殖研究,到目前为止已有100多种药用植物经离体培养获得试管植株,其中有的还利用试管繁殖技术生产用于栽培种植药材,如苦丁茶、芦荟、怀地黄、枸杞、金钱莲等。宁夏农林科学院枸杞研究所利用试管繁殖与嫩枝扦插相结合的方法繁殖新品种“宁杞一号”和“宁杞二号”苗木100多万株,加速了该品种的推广。

3.3 培养技术

植物组织培养技术不断提高,从固体、液体静态、悬浮培养,到深层大罐发酵、液体连续培养和细胞固定化培养等。最近人们对植物组织培养电刺激效应进行了探讨,应用诱导剂、稀土和体外胁迫等对植物组织培养产生药物成份进行了研究。在组织培养过程中也建立了一些相应的技术,如放射免疫测定法、复制平板技术、微滴试验、荧光

显微镜术和高效液相色谱法,对筛选和获得高产细胞株非常重要。

3.4 产业化情况

植物组织培养发展至今已有半个世纪,虽然人参和硬紫草的细胞培养在日本已经工业化,日本黄连、毛花毛地黄的细胞培养进行了中试,但进行大规模工业生产的植物细胞培养不多,这可能与高等植物细胞增殖速度慢、产物浓度低及大面积种植药用植物等因素有关。

4 目前药用植物的组织培养的主要应用

4.1 利用试管微繁生产大量种苗以满足药用植物人工栽培的需要

药用植物种苗的快速繁殖由于野生药材资源日益枯竭,人工栽培品种品质不稳定,生物技术的兴起对传统药材的生产展示了广泛的应用前景。组织培养是现代最先进的植物繁殖技术,通过利用植物细胞再生能力,培育出完整植株。利用植物组织培养技术进行药用植株无性繁殖,解决药用植物天然资源不足的棘手问题,具有成本低、高效率、生产周期短、无性遗传特性一致的优点。特别是对某些种子繁殖慢、难繁殖的药用植物。组织培养通过选择材料的部位(如根、茎、叶的段、片、块等),运用培养基获得芽体,最后培养成为植株。现在已经在药用植物中广泛应用,已在上百种药用植物上成功完成组织培养。例如组织培养技术已成功运用于石斛、桔梗、丹参、地黄、绞股蓝、半夏、杜仲、怀山药、麻黄、银杏、肉苁蓉、黄芪、红景天、西洋参、雪莲、桔梗、五味子、何首乌、金线莲等药用植物。此外在药用植物育种方面,一些药用植物收种困难或种子的发芽率低,有的栽种时耗种量大而繁殖系数小(例如贝母、番红花),运用组织培养可以短期内繁殖出植株,解决供种不足的问题。在预防病虫害方面,该项技术主要运用在因病毒病害严重影响产量和质量的药用植物、靠有性繁殖提供种子而种子发育不完善或种子成本高的药用植物、依靠无性繁殖提供“种子”而无性繁殖系数低且种子需求量大的药用植物、濒危或有极高药用价值的药用植物的引种驯化。Statish M. Nalawade et al(2003)研究了中国台湾的药用植物和持续利用,成功进行了某些药用植物的组织培养。

4.2 通过愈伤组织或悬浮细胞的大量培养,从细胞或培养基直接提取药物,或通过生物转化、酶促反应生产药物

植物组织、细胞培养生产次生代谢产物,次生代谢物是药用植物重要有效成分,但由于野生资源日益减少和栽培品种品质退化,给临床使用和质量控制带来许多困扰。利用组织培养生产有效成分,能缓解药用植物资源压力。对于那些生长条件要求严格、生长缓慢、产量小、采集困难、价值贵重的植物药,用这种方法更具有重要意义。利用植物组织、细胞培养生产次生代谢产物能克服以上缺点。例如天然抗癌药物紫杉醇在红豆杉植物中含量很低,即使现在公认含量最高的短叶红豆杉树皮中也仅有 0.069%。通过采用固定化植物细胞培养技术可以克服细胞大量培养中的许多困难,以小规模的培养细胞大量生产胞外目的产物。因为包埋于惰性基质的固定化提供了适于细胞分化的条件,结果提高了次生物质的产量,如熏衣草细胞的固定化培养,辽宁紫草细胞的固定化培养等都取得了很好的效果。次生化合物的合成需要相当多的代谢酶(包括同工酶)基因参与,这些基因的遗传变异直接影响药材的功效。目前已有不少调控次生化合物代谢的关键酶基因被研究。例如,苯丙烷类代谢酶系是目前了解最清楚的植物次生代谢物合成途径,其中许多酶基因已被克隆。黄酮、水杨酸等的生物合成都由此途径合成,这个途径的关键酶是本丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(CA4H)和 4-香豆酸 CoA 连接酶(4CL)。

发状根培养生产次生代谢产物传统的中药材含有的有效成分绝大部分是次生代谢产物,它们的合成途径非常复杂,往往有几十个酶参与反应,因此寻找出形成特定产物的关键酶就成为利用基因工程技术生产传统有效成分的关键步骤之一。发根培养技术的应用利用植物细胞培养技术生产次生代谢物真正实现商品性工业化生产的还为数甚少,其主要原因在于培养的植物细胞生长缓慢,次生代谢物含量太低,以及生产能力不稳定等,因而工业化生产成本太高。台湾 Mulabagal Vanisrec et al(2004)通过组织培养从某些药用植物提取重要的次生代谢物。

由发根农杆菌感染双子叶植物形成的毛状根,在近十几年来中已发展成继细胞培养后又一新的培养系统。发根是整体植株或其某一器官、组织

(包括愈伤组织)、单细胞甚至原生质体受发根农杆菌的感染所产生的一种病理现象(形成多分枝的不定根)。自从发根技术应用于次生代谢物生产以来,已有不少植物被诱导产生了发根,且次生代谢物的含量也大大提高,如人参愈伤组织发根培养生产人参皂苷,长春花发根培养产生长春碱等等。据不完全统计,目前已有 400 多种植物建立了组织和细胞培养体系,并从中分离出 600 多种代谢产物。其中代表性的研究成果如:中国科学院植物研究所的紫草细胞大规模培养。华中理工大学的红豆杉细胞大规模培养,上海中医药大学的黄芪毛状根大规模培养等。生物技术的发展给制药业带来了新工艺,例如各种层析技术特别是亲和层析技术,已用于制药生产,并带来了明显的收效。应用细胞工程技术已培养成功了多种菌类中草药,如冬虫夏草、灵芝等,使一些名贵的中草药可以用发酵的方法生产出来。细胞培养不仅可以保存和繁殖濒临灭绝的野生药用植物资源,还可以大量生产临床上急需的紧缺的中药材,而且还可以改进现有药材的品质。高山林等研究了培育优质品种的新途径,他们用秋水仙碱诱导出丹参四倍体,经染色体鉴定为同源四倍体,试管苗移栽后,发现其主要化学成分含量大大高于原(二倍体)植株。张荫麟等用根瘤农杆菌感染丹参无菌苗获得冠瘿组织,并发现 B5 和 MS 培养基有利于冠瘿组织的生长,而 6,7-V 和 WP 培养基则有利于丹参酮的合成。Chert(1999)等用发状农杆菌的 ATTCl5834 株系转化丹参胚细胞产生发状根,发状根可产生丹参酮类和酚酸类两类化合物。

5 结语

药用植物在中国传统医学中具有重要地位。近年来,植物组织培养技术也渗入到了古老的中药研究中,它丰富了传统药用植物研究内容,借助植物组织培养,可以保存和繁殖那些濒临灭绝的药材资源,保持自然界生物的多样性,为解决传统药材的资源与品质提供崭新的途径。而药用植物的组织培养作为生物制药的主要技术之一是生物工程研究开发和应用中最活跃、进展最快的领域,被公认为是 21 世纪最有前途的产业之一。与传统生产方式相比较植物组织培养技术进行传统药材生产具有的最大优点是:药材(或活性成分)的生产可以在人为控制条件下进行,不受季节、气候条件与土壤环境等因素的制约,可排除病虫害的侵

中药有效成分提取方法及其新进展

张延妮^{1,2}, 岳宣峰¹

(1. 药用植物资源与天然药物化学教育部重点实验室, 陕西 西安 710062;

2. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710062)

提 要: 陕西中药资源丰富, 种类繁多, 笔者对中药有效成分提取的方法进行了综述, 阐述了特点、应用范围及研究现状, 旨在为中药有效成分的提取工作提供参考。

关键词: 中药; 有效成分; 提取

中药有效成分的提取, 是指从原料药材中分离有效成分的单元操作, 直接关系到中药有效成分的得率和后续加工的难易程度。传统的从中药中提取有效成分的方法主要有溶剂提取法、水蒸汽蒸馏法以及升华法等^[1]。这些传统的方法普遍存在着提取率不高、杂质消除率低、能耗高、生产周期长等缺点, 直接制约了中药现代化的发展。近年来, 一些新的技术, 如超声场强化、超临界流体萃取以及微波辅助提取技术等被广泛应用于中药有效成分的提取过程中。研究结果表明, 应用这些新技术的新的中药有效成分的提取方法具有产率高、纯度高、提取速度快等优点, 有着广阔美好的应用前景。

1 超声提取法

超声波是一种高频机械波, 这种特殊的物理环境使细胞中的有效成分能够直接与溶剂接触并溶解在其中, 提高有效成分的提取率。

袁忠海等^[2]探索了超声波处理对提取魔芋精粉中葡甘露聚糖的影响, 并将其与常规水提法进

行了比较, 实验结果显示, 超声水提法省时、可靠, 并且能够提高魔芋精粉中葡甘露聚糖的提取效率。

超声波提取法在中药提取中已显示出明显的优势, 在实验室中已成功地应用于皂苷类、生物碱类、黄酮类、蒽醌类、有机酸类及多糖类等成分的提取。超声波提取法无须加热, 且提取时间短, 提取率高, 可以作为实验室和大生产的模拟工艺。但是超声波提取对容器壁的厚薄及容器放置位置要求较高, 否则会影响药材浸出效果, 而且超声波发生器工作噪音比较大, 所以工业应用有一定的困难, 这些问题都有待于进一步解决。

2 超临界流体提取法

超临界流体提取法是利用超临界状态下的流体所具有的高密度、低粘度等特征提取中药有效成分, 然后通过降压的方法, 将溶剂与溶质相分开, 具有萃取和蒸馏双重作用。由于 CO₂ 本身无毒无腐蚀性, 临界条件适中, 故成为超临界流体提取法中最常用的超临界流体。

收稿日期: 2006—04—26

基金项目: 陕西师范大学青年基金项目。

作者简介: 张延妮(1978—), 女, 陕西铜川人, 陕西师范大学讲师。

袭与农药残留量的困扰, 使药材质量稳定。而且人们可以利用植物组织培养技术将那些数量极少而又极有价值的新类型药用植物进行扩增, 满足临床的需求, 带动了传统中药学科的发展并推动中药现代化的进程。目前中国正在加快中药现代化、标准化、国际化的进程, 中药产业正面临着前所未有的机遇和挑战。今后着重对药用植物优良农艺性状基因进行研究, 寻找新的生理活性成分或先

导化合物以开发新药。毫无疑问, 今后植物组织培养技术在药用植物研究中的应用将具有十分广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 王秀丽, 等. 植物组织培养的应用及进展[J]. 山东农业科学, 2005, (3): 78~80.
- [2] 谭勇, 等. 生物技术在中国药用植物研究中的应用[J]. 中国农学通报, 2005, 21(10): 41~46.