

影响了种子和壳中有效成分的合成和转运,种子和壳中连翘酯苷、连翘苷和芦丁的量急剧下降;而叶仍能正常生长,叶中有效成分变化较小。

3.2 连翘分青翘和老翘(黄翘),青翘和老翘因采收时间和加工方法不同而成。秋季果实初熟尚带绿色时采收,除去杂质,蒸熟,晒干,习称“青翘”;果实熟透时采收,晒干,除去杂质,习称“老翘”。连翘产区“采青”时间过长,采收期混乱,造成连翘品质差异较大,质量不稳定,严重影响了连翘及以连翘为原料的制剂的进一步开发和利用。本实验研究表明,8月下旬至9月上旬,果实的干物质趋于稳定,种子和壳中连翘酯苷的量接近,且种子和壳中连翘酯苷、连翘苷和芦丁的量较稳定,波动小,此时采收青翘质量较稳定,有利于青翘的质量控制,且不会影响连翘的总产量。壳中连翘酯苷、连翘苷、芦丁的量经9~10月质量分数快速下降后,10月20日左右有效成分的量趋于稳定并达最低,果实黄化并开裂,种子脱落,此时采收老翘品质较好,且有助于老翘的质量控制。

3.3 青翘为连翘的整个果实,包含种子和壳,老翘

为种子脱落后的果壳,研究表明,青翘中连翘酯苷的量约是老翘的20倍,连翘苷的量是老翘的4倍,芦丁的量是老翘的3倍;且青翘中连翘酯苷、连翘苷和芦丁的相对质量分数连翘酯苷>连翘苷>芦丁,而老翘中连翘酯苷>芦丁>连翘苷,青翘和老翘有效成分间的比例差异较大。药材中不同有效成分之间的量及其比例是药材药效好坏的决定因子,因此青翘和老翘应该进行区别使用,传统中医一般以老翘入药。文献报道,就抗菌效价而言青翘优于老翘,关于青翘与老翘的药效差异,有待于进一步研究。

3.4 叶中有效成分的种类与种子和壳相似;叶中连翘酯苷的量低于种子和壳,连翘苷和芦丁的量高于种子和壳,且在整个生长过程中,变化较小。叶是否可替代果实入药,有待进一步研究。

References:

- [1] Zhang W T, He A, Chen H. Fingerprint analyses of *Fructus Forsythiae* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(5): 357-360.
- [2] Buchanan B, Grussem W, Jones R. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* [M]. Reckville: The American Society of Plant Physiologists, 2004.

黄芩愈伤组织培养及黄芩苷合成调控的研究

王梦亮¹,任振兴²,黄登宇²,刘滇生¹

(1. 山西大学现代化学研究所,山西太原 030006; 2. 山西大学生命科学与技术学院,山西太原 030006)

摘要:目的 研究黄芩愈伤组织培养和黄芩苷合成调控的规律。方法 采用植物细胞培养技术诱导愈伤组织;HPLC法测定黄芩苷的量。结果 黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累的优势培养条件为:在基本培养基MS中氮源浓度为60 mmol/L(NH₄⁺:NO₃⁻为1:1),KH₂PO₄浓度0.5~1.5 mmol/L,附加80 g/L蔗糖,0.3 mg/L IAA,2 mg/L 6-BA和200 mg/L蛋白胨,温度:(25±1)℃,暗培养。培养40 d后收获愈伤组织,生物量达28.7 g/L,黄芩苷为167.4 mg/g,明显高于野生黄芩的最高量。结论 黄芩愈伤组织的生长和黄芩苷的积累并不同步,而是先生长后合成。蔗糖对黄芩苷的合成具有明显的调节作用,在蔗糖质量浓度小于3%时,能有效促进愈伤组织的生长,但对黄芩苷的合成没有刺激作用;当蔗糖质量浓度在3%~8%时,愈伤组织表现出明显的生长和次生代谢功能,黄芩愈伤组织的生长及黄芩苷合成明显增加;当蔗糖质量浓度在8%时,两者均达到最大值。

关键词:黄芩;黄芩苷;愈伤组织培养;HPLC

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)06-0924-05

Regulation of callus culture and baicalin synthesis in *Scutellaria baicalensis*

WANG Meng-liang¹, REN Zhen-xing², HUANG Deng-yu², LIU Dian-sheng¹

(1. Institute of Modern Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Institute of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Objective To study the rule of callus culture and baicalin synthesis in *Scutellaria baicalensis*

收稿日期:2005-11-02

基金项目:山西省攻关项目(051039-4)

作者简介:王梦亮(1966—),男,山西平遥人,山西大学现代化学研究所副所长,硕士生导师,从事中草药的研究开发、生物化工等的科研工作。Tel:(0351)7016101 E-mail:mlwang@sxu.edu.cn

sis. Methods Callus was induced by plant cell culture technology and the content of baicalin was determined by HPLC. **Results** The optimal culture medium on the growth of callus and the synthesis of baicalin in *S. baicalensis* is: MS culture medium, 60 mmol/L ($\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^- = 1 : 1$), 0.5—1.5 mmol/L KH_2PO_4 , 80 g/L sucrose, 0.3 mg/L IAA, 2 mg/L 6-BA, and 200 mg/L peptone. When it was cultured for 40 d, the total biomass reached 28.7 g/L and the content of baicalin was 167.4 mg/g, which was much higher than that of wild *S. baicalensis*. **Conclusion** The growth of *S. baicalensis* callus and the accumulation of baicalin are not underway simultaneously; the callus grows first and then its secondary metabolic products synthesize. It is obvious for sucrose to regulate the baicalin synthesis. When the concentration of sucrose is less than 3%, it could only promote the callus growth; when between 3% and 8%, it could greatly increase not only the callus growth but also the baicalin synthesis, when 8%, both of them arrive to the maximum content.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; baicalin; callus culture; HPLC

黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,性寒味苦、具有清热燥湿、泻火解毒的功效^[1],含数种黄酮苷,黄芩苷(baicalin)是其主要有效成分。目前国内外对黄芩苷研究主要以抗氧化^[2]、抗 HIV^[3,4]和消除自由基^[5]为热点,带动了受体、酶和活性成分的分离鉴定,以及生物技术活性成分的组织培养等方面的开发应用,因此受到人们的普遍关注^[6~8]。

当前国内外对黄芩组织培养的研究主要集中在快繁技术和利用毛状根培养系统提高次生代谢产物的产量,如高山林等^[9]利用黄芩组织培养克隆化快速繁殖技术,为保护黄芩的野生资源,发展人工资源和探讨育种新途径奠定了基础。Nishikawa 等^[10]将发根农杆菌 ATCC 15834 含有的 Ri-质粒中的 T-DNA 片段整合到黄芩愈伤组织上,诱导出毛状根,进行黄芩的毛状根培养,从而提高黄芩的次生代谢产物的产量。本实验的目的就是通过植物细胞培养的方法,对黄芩愈伤组织生长及其主要次级代谢产物黄芩苷合成规律进行研究。

1 材料与方法

1.1 仪器:高效液相色谱仪(Waters, 2487 紫外检测器, Breeze 色谱工作站), SPX-250-GB 光照培养箱(上海医疗器械厂), JY98-3 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所)。

1.2 试剂与药品:甲醇为色谱纯,中国医药(集团)上海化学试剂公司,水(重蒸馏水),黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所),其余试剂均为 AR 级。

黄芩种子由山西省陵川县农业综合开发局提供,经山西大学药学系秦雪梅教授鉴定。

1.3 黄芩愈伤组织的诱导培养

1.3.1 黄芩试管苗的获得:取黄芩种子用自来水漂

洗干净后放入 75%乙醇中消毒 1 min,转入 2%次氯酸钠溶液中消毒 10 min,然后用无菌水冲洗 5 次,接种在用 MS 培养基(附加 0.2 mg/L 6-BA)上无菌萌发,大约在两周后获得无菌苗。

1.3.2 黄芩愈伤组织的诱导:取黄芩试管苗 0.5 cm 左右的茎接种于诱导培养基:MS+2.0 mg/L 6-BA+0.20 mg/L IAA 培养基中,其中含蔗糖 3%, pH 5.8, (25±1) °C 暗培养。大约在培养两周后,在茎与培养基接壤处出现灰白色的愈伤组织。6 周后将诱导出的愈伤组织进行继代培养,其培养条件同诱导培养基。连续继代 2~3 次后,即可得到脱分化完全的愈伤组织。

1.4 黄芩愈伤组织在不同培养基上的增长量与黄芩苷的测定

1.4.1 黄芩愈伤组织生长增量:黄芩愈伤组织的生长周期为 40 d 左右,故在生长 40 d 后收获愈伤组织,称量愈伤组织记为生长鲜质量,再在 60 °C 烘箱中烘至恒重,记为愈伤组织的总生物量。再减去接种量(每 100 mL 培养基接种 1 g)就是愈伤组织增长量。

1.4.2 黄芩愈伤组织中黄芩苷的测定^[1]:色谱条件:ODS 色谱柱(150 mm×4.6 mm,大连依利特科学仪器有限公司),流动相:水-甲醇-磷酸为 47:53:0.2,检测波长:280 nm,柱温:室温,进样量 20 μL,体积流量:1 mL/min。

黄芩愈伤组织提取液的制备:称取 0.3 g 黄芩愈伤组织干粉,加 50%乙醇 80 mL 超声破碎 20 min,定容至 100 mL,精密移取上清液 1 mL 于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,微孔滤膜滤过后进样。

对照品溶液的制备:精密称取黄芩苷对照品适量,用甲醇配成 0.12 mg/mL 溶液,作为对照品溶液。

标准曲线制备:取 0.12 mg/mL 对照品溶液,按

一定的比例用甲醇稀释成 120、60、48、38.4、30.7、18.4、11.0、2.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,各取 20 μL ,注入色谱仪,记录色谱图。以质量浓度为横坐标,相应的峰面积为纵坐标得回归方程: $Y=78\ 776 X-47\ 513$, $r=0.999\ 4$,线性范围为 2.6~120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

测定:按外标法以峰面积计算供试品溶液中黄芩苷的量。

2 结果

2.1 不同碳源对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累的影响:考察了蔗糖、葡萄糖、麦芽糖和甘露醇 4 种碳源对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累的影响。结果见表 1。可以看出,无论对于黄芩愈伤组织生长还是黄芩苷的量,蔗糖都是一种最佳的碳源。

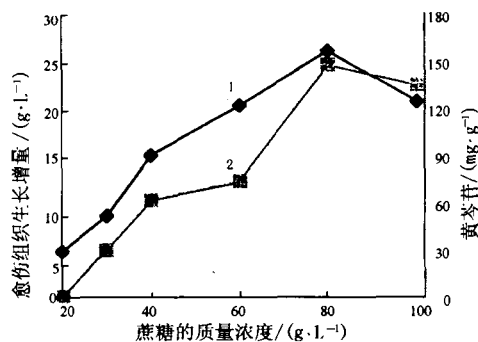
表 1 不同碳源对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷量的影响(碳源质量浓度 3%)

Table 1 Effects of different carbon sources on callus growth and baicalin (concentration of carbon source was 3%)

碳源	鲜重增量/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	干重增量/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	黄芩苷/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$
甘露醇	不生长	0	0
麦芽糖	77.5	3.13	不合成
葡萄糖	110	3.95	16.1
蔗糖	256	8.73	30.2

2.2 不同蔗糖质量浓度对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累的影响:在含 2%~10%蔗糖、6-BA 2.0 mg/L 、IAA 0.2 mg/L 的 MS 培养基中接入愈伤组织,培养 40 d 后,测定愈伤组织生长增量和黄芩苷的量,结果见图 1。可以看出,随着培养基中蔗糖质量浓度的增加,愈伤组织生长量明显增加,但高到一定质量浓度(100 g/L)后,黄芩愈伤组织生长和黄芩苷的积累都受到抑制。另外还发现,愈伤组织团的含水量明显地随着蔗糖的升高而减小(从 96.5%减少到 84.4%),这可能是培养基中渗透压增高所致。就黄芩苷的合成情况而言,在 2%蔗糖培养基中并不合成黄芩苷,在 3%蔗糖中开始合成,而 8%蔗糖合成黄芩苷的量几乎是 3%蔗糖的 5 倍。增加蔗糖的质量浓度有利于黄芩苷的合成,且在一定范围内不影响愈伤组织生长。

此外,为了进一步探索黄芩苷生成的规律,对蔗糖为 3%的黄芩愈伤组织分别在培养 10、15、20、25、30、35、40、50 d 进行了黄芩苷测定,结果见图 2。可以看出,黄芩苷是从培养 20 d 后开始合成,25~35 d 为快速合成期,即黄芩愈伤组织的生长和黄芩苷的积累并不同步,而是先生长后合成。



1-愈伤组织生长增量 2-黄芩苷的量(下同)

1-callus growth yield 2-baicalin content (same below)

图 1 不同质量浓度蔗糖对愈伤组织生长和黄芩苷量的影响

Fig. 1 Effects of various concentrations of sucroses on callus growth and baicalin content

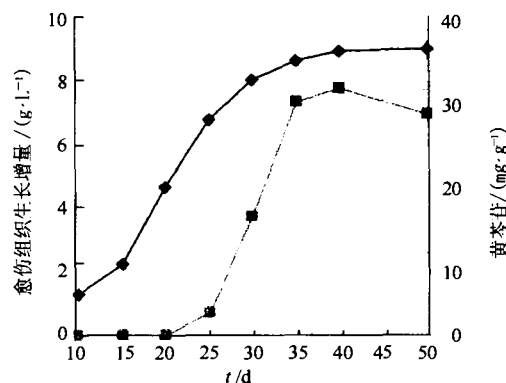


图 2 黄芩苷合成规律的试验结果

Fig. 2 Synthesis regulation of baicalin

2.3 有机添加物对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累的影响:一般认为,加入一些有机添加物对愈伤组织的早期生长有利。为了考察有机添加物对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷量的影响,添加了牛肉膏、蛋白胨和酵母粉 3 种有机物,添加量为 200 mg/L ,其结果见表 2。可以看出,牛肉膏和蛋白胨均能促进黄芩愈伤组织的生长,但对黄芩苷的积累没有太大的影响,而酵母粉对愈伤组织生长和黄芩苷的积累都有抑制作用,可能是因为其中含有某些抑制成分所致。

表 2 有机添加物对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷量的影响

Table 2 Effects of various organic additions on callus growth and baicalin

有机添加物	鲜重增量/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	干重增量/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	黄芩苷/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$
对照	256	8.73	30.2
牛肉膏	261	11.3	24.9
蛋白胨	293	12.1	27.4
酵母粉	142	6.33	9.04

2.4 生长调节物质对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累的影响:见表 3。可以看出,单独加入 NAA, 2, 4-D, IAA, 6-BA 和 KT 时,黄芩愈伤组织的生物量以 IAA 最大,单独加 KT 和 2,4-D,几乎不生长,而黄芩苷的量则以 NAA 最高。不同的生长调节物质组合加入时,IAA 和 6-BA 组合最好,生物量和黄芩苷的量都最高,NAA 和 6-BA 的组合次之,而 2,4-D 和 6-BA 组合,其愈伤组织严重褐化。

当固定 IAA 的质量浓度为 0.2 mg/L 时,生物量随 6-BA 质量浓度的增大而明显增加,当 6-BA 高于 3 mg/L 时,其生长趋势又明显减弱。黄芩苷的量则在 6-BA 为 2 mg/L 时,比 6-BA 为 3 mg/L 时大将近 40%,达到最大值(30.2 mg/g)(图 3)。

表 3 几种生长调节物质对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷产量的影响

Table 3 Effects of various growth-regulators on callus growth and baicalin

生长调节物质	鲜重增量/ (g · L ⁻¹)	干重增量/ (g · L ⁻¹)	黄芩苷/ (mg · g ⁻¹)
6-BA	148	2.12	6.50
NAA	68	3.30	11.6
2,4-D	褐化	0	0
IAA	103	4.63	5.91
KT	不生长	0	0
6-BA+IAA	256	8.73	30.2
6-BA+NAA	215	7.35	22.0
6-BA+2,4-D	严重褐化	0	0

生长调节物质单独加时的质量浓度为 0.2 mg/L,组合加时,6-BA 为 2 mg/L,其余均为 0.2 mg/L

Growth regulator was separately added by 0.2 mg/L, when combined, 6-BA was 2 mg/L and others were 0.2 mg/L

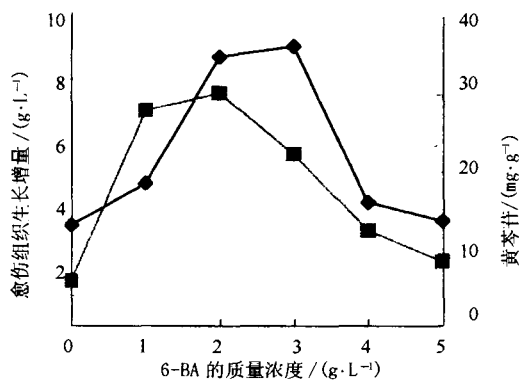


图 3 不同质量浓度的 6-BA 愈伤组织生长和黄芩苷量的影响

Fig. 3 Effects of various concentrations of 6-BA on callus growth and baicalin

当固定 6-BA 的质量浓度为 2 mg/L 时,生物量在不加 IAA 时很低,随 IAA 的质量浓度的增大而明显增加,IAA 在 0.3~0.5 mg/L 时达到最大值,当大于 1.0 mg/L 时,愈伤组织生长又受到明显抑制。黄芩苷的量在为 0.3 mg/L 时达到最大值(35.7 mg/g),随着 IAA 质量浓度的增加出现减小的趋势(图 4)。

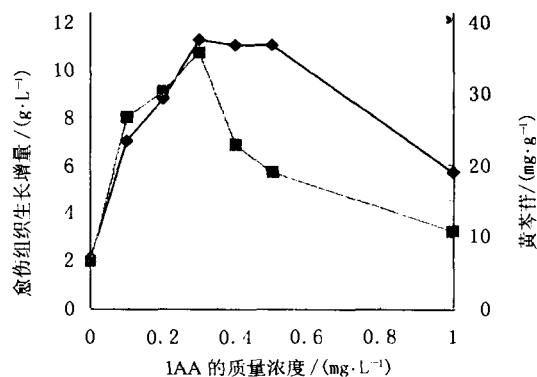


图 4 不同质量浓度的 IAA 对愈伤组织生长和黄芩苷量的影响

Fig. 4 Effects of various concentrations of IAA on callus growth and baicalin

2.5 氮源对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累的影响:植物愈伤组织培养通常采用一定量的硝酸盐和铵盐作为混合无机氮源,单独以铵盐或者硝酸盐为氮源,都对愈伤组织的生长和次级代谢物的生成不利,黄芩愈伤组织生长对 NH₄⁺和 NO₃⁻的需求是有差别的,氮源对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累的影响结果见表 4(总氮浓度为 50 mmol/L)。结果表明:NH₄⁺:NO₃⁻为 1:1 时,生物量和黄芩苷的量均达到最高。

表 4 NH₄⁺和 NO₃⁻浓度比例对愈伤组织生长和黄芩苷积累的影响

Table 4 Effects of various nitrogen source concentrations on callus growth and baicalin accumulation

NH ₄ ⁺ :NO ₃ ⁻	鲜重增量/ (g · L ⁻¹)	干重增量/ (g · L ⁻¹)	黄芩苷/ (mg · g ⁻¹)
1:0	不生长	0	0
0:1	86.5	4.73	5.91
1:1	197	10.47	34.88
1:2	165	9.34	11.87
2:1	144	8.65	4.82

另外,NH₄⁺:NO₃⁻为 1:1 时,培养基中总氮浓度变化的影响结果表明,总氮为 60 mmol/L 时,愈伤组织生长较好(11.32 g/L),黄芩苷的量最高(37.64 mg/g);总氮达 120 mmol/L 时,愈伤组织生

长受抑,黄芩苷的量也显著减低(5.76 mg/g)。因此,适宜的氮源浓度为 60 mmol/L(其中 NH_4^+ : NO_3^- 为 1 : 1)

2.6 磷酸盐对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累的影响:见图 5。可以看出,当 KH_2PO_4 在小于 0.5 mmol/L 时,生物量随着 KH_2PO_4 浓度的增加而明显增大,在 0.5~2.5 mmol/L 时增加幅度不大。黄芩苷的量在 1.5 mmol/L 时达到最大值(26.73 mg/g)。因此, KH_2PO_4 的浓度不宜过高,以 0.5~1.5 mmol/L 较为适宜。

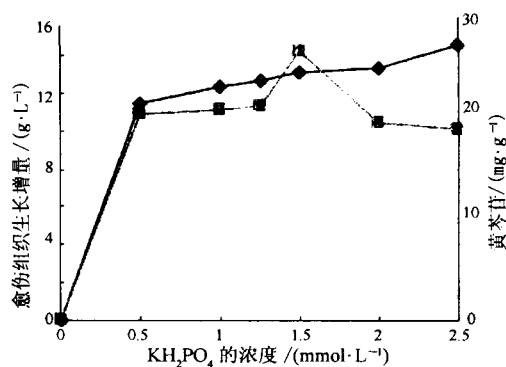


图 5 不同浓度的 KH_2PO_4 对愈伤组织生长和黄芩苷量的影响

Fig. 5 Effects of various concentrations of KH_2PO_4 on callus growth and baicalin

3 讨论

黄芩愈伤组织的生长和黄芩苷的积累并不同步,而是先生长后合成。蔗糖对黄芩苷的合成具有明显的调节作用,在小于 3% 时,能有效促进愈伤组织的生长,但对黄芩苷的合成没有刺激作用,当蔗糖在 3%~8% 时愈伤组织表现出明显的生长和次生代谢功能,黄芩愈伤组织的生长及黄芩苷合成明显增加,

到 8% 时二者均达到最大值。黄芩是一种两年生的中药,其黄芩苷的大量合成在次年进行,这可能与体内光积累和蔗糖浓度有关,实验结果与天然状态下黄芩苷的积累情况相似。另外,黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累还受多种因子的调控作用,本研究结果表明,黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累的优势培养条件:在基本培养基 MS 中氮源浓度为 60 mmol/L (NH_4^+ : NO_3^- 为 1 : 1), KH_2PO_4 浓度 0.5~1.5 mmol/L 时,附加 80 g/L 蔗糖,0.3 mg/L IAA、2 mg/L 6-BA 和 200 mg/L 蛋白胍(25±1) °C,暗培养。愈伤组织培养 40 d,生物量达 28.7 g/L,黄芩苷量 167.4 mg/g,明显高于野生黄芩的量。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Yoshino M, Murakami K. Interaction of Iron with polyphenolic compounds application to antioxidant characterization [J]. *Anal Biochem*, 1998, 257: 40-44.
- [3] Li B Q, Fu T, Yao D Y, et al. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276(2): 534-538.
- [4] Kitamura K, Honda M, Yoshizki H, et al. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production *in vitro* [J]. *Antiviral Res*, 1998, 37: 131-140.
- [5] Gao Z H, Huang K X, Yang X L, et al. Free radical scavenging and antioxidant activity of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Geogi [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1472: 643-650.
- [6] Teresa K, Bao Q L, Howard A Y. The flavonoid baicalin inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines [J]. *FEBS Lett*, 2001, 500: 52-55.
- [7] Ishimaru K, Nishikawa K, Omoto T, et al. Two flavone 2-glucosides from *scutellaria baicalensis* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(1): 279-281.
- [8] Li H B, Yue J, Chen F. Separation methods used for *Scutellaria baicalensis* active components [J]. *Chromatogr Abstr*, 2004, 812: 277-290.
- [9] Gao S L, Chen B J. Optimization on cloning rapid-propagation technology by tissue culture in *Scutellaria baicalensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(3): 312-315.
- [10] Nishikawa K, Furukawa H, Fujii H, et al. Flavone production in transformed root cultures of *Scutellaria baicalensis* Geogi [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52: 885-889.

铁皮石斛根尖诱导丛生芽研究

詹忠根

(浙江经贸职业技术学院, 浙江 杭州 310018)

摘要:目的 探索铁皮石斛根尖再生丛生芽的适宜条件及类原球茎的起源。方法 切取 0.3~0.5 cm 的根尖为外植体,以 B5 为基本培养基,附加不同种类和质量浓度的植物生长调节剂进行培养。结果 诱导根尖形成了愈伤组织、类原球茎或直接转化成芽且获得再生植株。通过细胞学观察认为铁皮石斛的类原球茎是单细胞起源的体细胞胚。结论 为铁皮石斛组织快繁建立新的体系。

关键词:铁皮石斛;愈伤组织;类原球茎;体细胞胚发生

收稿日期:2005-10-12

作者简介:詹忠根(1971—),男,浙江江山人,硕士研究生,主要从事组织培养研究。

Tel:(0571)85919482 E-mail:zhzg9321@tom.com.