

黄芩组织培养研究进展

华智锐, 李小玲 (商洛学院生物医药工程系, 陕西商洛 726000)

摘要 从组织培养、细胞悬浮培养、多倍体诱导、克隆技术等方面综述黄芩组织培养技术应用的研究进展。

关键词 黄芩; 组织培养; 综述

中图分类号 S336 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)13-05293-02

Research Progress on the Tissue Culture of *Scutellaria baicalensis*

HUA Zhi-rui et al (Department of Biological Medicine Engineering, Shangluo University, Shangluo, Shaanxi 726000)

Abstract The research progresses on the application of tissue culture technologies of *Scutellaria baicalensis* were summarized from the aspects of tissue culture, cell suspension culture, polyploid induction, cloning technology and so on.

Key words *Scutellaria baicalensis*; Tissue culture; Overview

黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)为唇形科植物的干燥根,为常用中药之一,临床疗效确切。黄芩药材生产主要采用种子或无性扦插繁殖。由于长期人工栽培会使药材品种退化、产量和质量下降、化学成分不稳定,因此需要进行品种更新和提纯复壮。近年来已有利用组织培养技术对黄芩进行研究,为进一步选育有效成分含量高、根部药材粗大、产量高的优良品种打下基础,从而使黄芩的药用部位在药材生产中得以充分利用。笔者综述黄芩组织培养技术,旨在探讨今后的研究方向,为黄芩的资源开发和利用以及更深入的生物技术研究提供依据和参考。

1 组织培养的快繁及优化

从黄芩幼苗的叶柄、子叶、根部取材进行培养,分别获得愈伤组织,用 HPLC 测定其中黄芩苷含量分别为 8.5%、7.1%、0.6%;黄芩素分别为 0.3%、1.2%、0.2%。均以鲜重计含量,60℃低温干燥后测定的黄芩苷含量下降 90%以上,而黄芩素则升高约 2 倍^[2]。

黄芩愈伤组织叶原基表皮和腺毛细胞中 β -葡萄糖醛酸酶具有很强的活性,与植物体的抗病机能和黄酮合成有关^[3]。用反相 HPLC 测定出黄芩试管苗根部黄芩素为 7%、汉黄芩素为 1.9%、千层纸黄素 A 为 1.3%,这一结果的意义在于这 2 种苷元的多种活性都比苷强,可以用这种途径来大量生产黄芩素和汉黄芩素。

黄芩以含量高低可分组为爱约黄芩(*Scutellaria iyoensis*)和范氏黄芩(*S. ventenatii*)(以黄芩苷、汉黄芩素 7-葡萄糖苷和汉黄芩素为主);侧花黄芩(*S. lateriflora*)(以黄芩素和汉黄芩素为主);灰毛黄芩(*S. incana*),东方黄芩(*S. orientalis*)和牛黄芩(*S. taurica*)(以汉黄芩素 7-葡萄糖苷和汉黄芩素为主);*S. pontica*,并头草(*S. galericulata*)和 *S. alpina*(以黄芩苷为主)。这 9 种黄芩的愈伤组织都能产生黄芩苷、汉黄芩素 7-葡萄糖苷、黄芩素、汉黄芩素、黄芩新素-I、黄芩新素-II、白杨黄素、acteoside 等 8 种黄酮类成分。爱约黄芩(*S. iyoensis*)中黄芩苷在光照培养和暗培养条件下的含量分别为 4.04%、4.06%,没有明显的差异^[4]。该项研究表明黄芩苷等是广泛存在的黄酮类化合物,如果中药黄芩有特殊药效的话,一定还有别的类型活性成分。

利用 MS(Murashige and Skoog)培养基增殖外植体来高效繁殖黄芩等的技术,是另一个扩大资源的途径。1986 年日本学者最早将黄芩茎切成 5 mm 长的节段接种于 LS 培养基中,得到了淡褐色的愈伤组织^[5]。我国学者丁如贤等于 1997 年将黄芩带节茎段培养在 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的培养基上,诱导形成了愈伤组织,然后出现许多绿色小芽,进一步移至 MS 培养基上产生大量的丛生芽,丛生芽培养于 1/2 MS+IBA 0.5 mg/L 培养基上可诱导生根,形成完整植株^[6]。后来李永红等用黄芩无菌茎段为外植体进行了快速繁殖,研究认为 MS+6-BA 2.0 mg/L 培养基有利于促进腋芽萌发和生长,并筛选出最有效的芽增殖培养基和生根培养基^[7]。高山林等在组织培养条件下进行了黄芩愈伤组织的诱导、分化、试管苗复壮和生根等一系列技术优化试验,表明黄芩试管苗的节是诱导愈伤组织的理想外植体,在培养基中适当添加 PP333 能显著改善试管苗的素质,PP333 与激素的配合使用能十分有效地调控黄芩愈伤组织的分化、试管苗的生长与生根,并能显著提高移栽成活率^[8]。王梦亮等研究结果表明,在暗培养条件下,黄芩愈伤组织生长和次级代谢物合成的最佳培养条件为:在基本培养基 MS 中氮源浓度为 60 mmol/L ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^- = 1:1$), KH_2PO_4 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 蛋白胍, (25 ± 1) ℃。培养 40 d 后收获愈伤组织生物量达 28.7 g/L,总黄酮的含量为 354.6 mg/g,黄芩苷的含量为 167.4 mg/g。并发现蔗糖作为一种最佳碳源,在黄芩次级代谢物合成过程中起着至关重要的作用^[9]。李康等采用均匀设计法,以黄芩甙含量为主要考察指标,对黄芩愈伤组织生长的 MS 培养基成分进行多因素多水平考察。结果发现最佳培养基为 MS 附加 0.25 mg/L NAA、0.5 mg/L 6-BA、17 g/L 葡萄糖和 35 g/L 蔗糖^[10]。孟庆华等还研究得出通过调节金属离子含量可以有效地提高黄芩愈伤组织生长率并显著提高其有效成分的含量^[11]。

2 细胞悬浮培养

通过细胞培养生产黄芩苷的上游技术,已经基本成熟,在黄芩的细胞悬浮培养过程中,维生素 C 的浓度不断增加,到 21 d 达到最高,约 120 ng/g(干细胞重),而且证明 L-半乳糖和 L-半乳糖-1,4-内酯是黄芩细胞培养中维生素 C 生物合成的重要前体^[12]。悬浮培养过程中细胞代谢产生大量 H_2O_2 ,并由于 β -葡萄糖醛酸酶的作用,使得黄芩苷水解成黄芩素,而黄芩素又很快被过氧化物酶氧化,影响黄芩素收率,可采

作者简介 华智锐(1980-),男,湖北黄石人,硕士,讲师,从事药用植物生物技术方面的研究。

收稿日期 2008-02-29

用 β -葡萄糖醛酸酶抑制剂糖酸1,4-内酯来降低 H_2O_2 的产生^[13]。实际上黄芩素本身就是 β -葡萄糖醛酸酶的抑制剂,可以阻止下一步的分解氧化反应^[14]。因此黄芩细胞悬浮中黄酮葡萄糖苷酶、葡萄糖酸酶和葡萄糖醛酸酶的活性成为调控关键。用酵母激发可使黄芩细胞悬浮培养诱导产生三萜类成分^[15]。

吴晓玲等采用不同激素配方,对黄芩细胞悬浮培养过程中的生长动态、干物质积累及次生代谢物总黄酮的生产能力进行了研究,筛选出适合黄芩细胞生长并且次生代谢产物总黄酮产量较高的培养基配方为:MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L^[16-18],为黄芩的大规模工厂化生产提供理论依据。

3 多倍体诱导

陈柏君等应用组织培养技术对黄芩进行了多倍体诱导,发现在培养基中添加一定浓度的秋水仙素,或者把带有绿色芽点的黄芩愈伤组织经0.2%秋水仙素溶液浸泡一定时间后再进行培养,均可诱导多倍体产生,而后者效果较好,诱导率可达40%。认为通过多倍体育种选育黄芩优质品种是一条有效的资源培育途径^[19]。高山林等用胶束电动毛细管电泳色谱(MEKC)法对通过组织培养诱导获得的20个黄芩多倍体株系、黄芩不同部位和不同采收期进行了黄芩苷含量的测定,结果表明:绝大部分四倍体株系黄芩苷的含量高于二倍体,且明显高于商品药材;黄芩主根、须根中黄芩苷的含量最高,根皮次之,茎叶中含量最低;黄芩种子成熟后期和冬季黄芩苷含量较高,春季发芽前后黄芩苷的含量就开始下降^[20]。此项研究结果说明在组织培养的基础上,采用多倍体育种方法可以有效地提高药用植物的有效成分含量,可望从中选出有效成分含量高的优良品系。为黄芩药材优良品种选育、黄芩苷含量的测定和黄芩质量评价建立了快速可靠和准确的测定方法。

4 克隆技术的应用

黄芩毛状根中黄酮-7-葡萄糖基转移酶的克隆和尿核苷二磷酸葡萄糖的基因表达^[21]。日本学者用聚合酶链式反应(PCR)技术将T-DNA直接植入获得黄芩的转基因毛状根,并从中分离到一种新的黄酮苷——5,7,2',6'-四甲氧基黄酮-2'-O- β -葡吡喃糖苷^[22]。从黄芩克隆体根部分离到黄芩新素I和acteoside 2种已知黄酮和1种新化合物^[23]。

5 结语

近年来,临床上对黄芩药材的需求量大增,有限的野生资源遭受了掠夺式采挖,导致黄芩野生资源破坏严重,野生资源储量锐减,有些地区濒临灭绝。人工栽培研究成为关注的焦点,许多研究者从其种质资源、生物学特性、繁殖技术、田间管理、采收加工、生物技术快速繁殖和生产次生代谢产物等各个方面进行了研究,为实现其产业化培育奠定了基础。虽然现有栽培面积较大,却存在种源混乱,水平较低,以及生物技术研究深入不够等问题,使栽培黄芩产量和质量均

不理想。所以加强生物技术在黄芩资源培育中的应用研究成为当务之急。一方面是利用组织培养、多倍体诱导等技术加快黄芩优良种质的繁殖利用;另一方面是要积极开展利用生物反应器直接生产黄芩药用有效成分的研究和技术成果转化,比如一些有效成分合成前体物质合成酶基因的克隆和转化等,利用生物技术从分子水平上进一步研究有效成分的作用机制。

参考文献

- [1] 中国医学科学院药物研究所,南京药学院,江苏省植物研究所,等.中药志(第一册)[M].北京:人民卫生出版社,1959:546.
- [2] HIROTANI M, NAGASHIM S, YOSHIKAWA T. Baicalin and baicalin productions of cultured *Scutellaria baicalensis* cells[J]. Nat Med, 1998, 52(5):440.
- [3] MATSUDA T, HATANO K, HARIOKA T, et al. Histochemical investigation of b-glucuronidase culture cells and regenerated plants of *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. Plant Cell Rep, 2000, 19(4):390.
- [4] NISHIKAWA K, FURUKAWA H, FUJIOKA T, et al. Phenolics in tissue cultures of *Scutellaria*[J]. Nat Med, 1999, 53(4):209.
- [5] HISAKA Y, NOBUYASU C, KUME W, et al. Effect of carbon sources on the growth and flavonoid formation of *Scutellaria baicalensis* stem callus cultures[J]. J Pharmacog, 1986, 40(1):19-21.
- [6] 丁如贤,张汉明,付翔.黄芩茎段直接诱导丛生芽[J].中草药,1998,29(3):194-195.
- [7] 李永红,赖秋雅,范淑君,等.黄芩的组织培养与快速繁殖研究[J].深圳职业技术学院学报,2003(2):16-18.
- [8] 高山林,陈柏君.黄芩组织培养快速繁殖技术的优化[J].中草药,2004,35(3):312-315.
- [9] 王梦亮,任振兴,刘演生.黄芩愈伤组织培养条件的研究[J].天然产物研究与开发,2007(19):202-205.
- [10] 李康,张东向,张磊,等.均匀设计法优化黄芩愈伤组织培养基[J].生物技术,2006,16(6):62-64.
- [11] 孟庆华,张控,赵利平.两种金属离子对黄芩愈伤组织培养及其次生代谢物积累的影响[J].陕西中医学院学报,2007,30(5):86.
- [12] AHN Y O, KWON S Y, LEE H S, et al. Biosynthesis and metabolism of vitamin C in suspension cultures of *Scutellaria baicalensis*[J]. J Biochem Mol Biol, 1999, 32(5):451-452.
- [13] SATOSHIM, NORIFUMIT, TOMUKOM. Novel hydrogen peroxide metabolism in suspension cells of *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. J Biol Chem, 1998, 273(20):12606-12608.
- [14] NISHIOKA T. NITES-Baicalin, an a-Glucosidase inhibitor for *Scutellaria baicalensis*[J]. J Nat Prod, 1998, 61(11):1413-1415.
- [15] YOON H J. Induced accumulation of triterpenoids in *Scutellaria baicalensis* suspension cultures use yeast elicitor[J]. BiotechnolLett, 2000, 22(13):1071-1075.
- [16] 吴晓玲,胡海英,王俊,等.黄芩愈伤组织诱导条件的优化[J].宁夏农林科技,2005(1):8-10.
- [17] 吴晓玲,胡海英,邓光存,等.黄芩愈伤组织诱导条件的研究[J].生物技术,2005,15(2):77-79.
- [18] 吴晓玲,邓光存,姜晓慧.黄芩细胞生长特性及次生代谢产物生产性能的研究[J].西北植物学报,2005,25(3):557-561.
- [19] 陈柏君,高山林,卞云云.黄芩组织培养同源四倍体的诱导[J].植物资源与环境学报,2000,9(1):9-11.
- [20] 高山林,刘峻,谢小群.高效毛细管电泳法测定黄芩多倍体株系中黄芩苷的含量[J].药物生物技术,2002,9(6):349-352.
- [21] HIROTANI M. Cloning and expression of UDP-glucose: flavonoid 7-O-glucosyltransferase from hairy root culture *Scutellaria baicalensis*[J]. Planta, 2000, 210(6):1006.
- [22] ZHOU Y. Flavonoids and phenylethanoids from hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*[J]. Phytochemistry, 1997, 44(1):83-87.
- [23] NISHIKAWAK, FURUKAWAH. Flavone production in transformed root cultures *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. Phytochemistry, 1999, 52(5):885-890.
- [24] 张东向,李康,张磊,等.不同理化因子对黄芩悬浮细胞系的影响[J].安徽农业科学,2007,35(5):1266-1268.