

· 资源与鉴定 ·

离体条件下培养物中冬凌草甲素积累 与其组织结构关系

苏秀红,董诚明*,史应强,陈随清,冯卫生,张丽萍,刘春朝
(河南中医学院,郑州 450008)

[摘要] **目的:**研究冬凌草甲素动态积累变化关键期培养物显微、超微结构的变化,探讨培养物组织结构与冬凌草甲素积累的相关性。**方法:**采用高效液相色谱法研究了离体培养过程中培养物内冬凌草甲素积累的动态变化规律。在此基础上,采用石蜡切片、透射电镜方法研究了培养物组织结构与冬凌草甲素积累的关系。**结果:**离体培养过程中培养物中冬凌草甲素积累表现出有-无-有的规律性,随着叶片外植体的脱分化,培养物内叶绿体数目逐渐减少,冬凌草甲素的含量也随之逐渐降低,当冬凌草甲素再次积累时,培养物内叶绿体数目再次增多且出现了维管组织的分化。**结论:**冬凌草甲素积累合成与培养物叶绿体数目的多少及内部维管系统的分化有着紧密的联系。

[关键词] 冬凌草;冬凌草甲素;愈伤组织;叶绿体

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0086-05

[doi] 10.11653/syjf2014030086

Study on Relationship Between Structure and Accumulation of Oridonin of Cultural Materials *in vitro*

SU Xiu-hong, DONG Cheng-ming*, SHI Ying-qiang, CHEN Sui-qing,
FENG Wei-sheng, ZHANG Li-ping, LIU Chun-chao
(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** Structure and ultrastructure of cultural materials were studied to explore the correlation between the structure and the accumulation of oridonin. **Method:** High performance liquid chromatography was used to determine the changes of oridonin *in vitro* *Rabdosia rubescens*. On the basis of it, the anatomy of cultural materials of *R. rubescens* were compared using light microscopy, and transmission electron microscopy. **Result:** The content of oridonin was higher in donor plant (leaf) tissues, but as they began to dedifferentiation into callus, oridonin were absent in the dedifferentiation callus, when the calli initiated organogenesis (bud primordial), it started appearing. As the leaf dedifferentiated into callus the number of chloroplast decreased. At the same time, the content of oridonin was decline until absent. But when the oridonin accumulated, the number of chloroplast increased again and the differentiation of vascular was founded in the cultural materials. **Conclusion:** The result showed that the number of chloroplast and differentiation of vascular played key role in biosynthetic pathway of oridonin.

[Key words] *Rabdosia rubescens*; oridonin; callus; chloroplast

[收稿日期] 20130318(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173486);河南中医学院创新人才项目(2011XCXRC02);河南省高等学校青年骨干教师计划项目(2011GGJS-089);河南省教育厅科学技术研究重点项目(13A360613)

[第一作者] 苏秀红,博士,副教授,从事药用植物学教学和科研,Tel:0371-65692746,E-mail:suxiahong80@163.com

[通讯作者] *董诚明,教授,从事中药材规范化种植研究,Tel:0371-65692746,E-mail:dcm663@sina.com

冬凌草为唇形科香茶菜属碎米桠以其地上草质部分入药,主含二萜类化合物,具有清热解毒、消炎止痛、健胃活血及抗肿瘤之功效。许多学者对冬凌草的化学成分研究发现,其中的抗癌活性成分主要为二萜类化合物-冬凌草甲素,它不仅对肿瘤细胞有着明显的抑制作用,且有明显的抗突变、抗氧化作用。正是由于以上药理作用和它在毒性实验中显示的无明显的毒性作用,已成为国内外医药学者研究的热点^[1],但目前对冬凌草甲素研究仅限于化学成分分离^[2-3]、含量测定^[4]、药理作用^[5]等方面。近年来有关冬凌草组织培养方面的报道虽然逐渐增多,但主要集中于冬凌草愈伤组织诱导、再生植株形成等方面^[6-8],而关于冬凌草甲素在植物及其培养物中的合成代谢调控的报道却很少^[9-11]。

本研究室通过愈伤组织途径建立了冬凌草离体培养体系^[8],并在此基础上对其离体再生过程中各个时期的冬凌草甲素积累动态进行研究,发现脱分化形成的冬凌草愈伤组织中未检测出冬凌草甲素,随着愈伤组织的再分化冬凌草甲素含量逐渐升高。类似的现象在离体培养条件下的印度人参 *Withania somnifera* (L.) Dunal、水仙 *Narcissus confuses* 等植物上也有报道。由此可见一定程度的形态分化对次生代谢上的化学分化是十分重要。

培养物细胞分化不仅仅表现在其外部形态特征上,其内部细胞显微、超微结构上的变化、甚至特殊形态细胞的形成,都会对次生代谢产物的积累造成一定的影响。如罂粟细胞悬浮培养中当鸦片碱的积累达到最高峰时,出现大量乳汁管样的细胞^[12]。由此可见,这些不同水平上的形态分化,即使是细胞器的微小变化,也可能是低产和高产培养物之间的一个显著差异。那么,离体培养条件下的冬凌草培养物内,在冬凌草甲素含量从无到有的关键时期是否也会有着细胞大小、形态及细胞器的变化,这种变化与冬凌草甲素的积累合成有着怎样的关系?值的进一步探讨。鉴此,本文采用高效液相色谱、石蜡切片、投射电子显微镜技术,探讨了离体条件下培养物药用成分及其内部组织结构的变化,旨在揭示培养物组织结构的改变与药用成分积累的关系。

1 材料

冬凌草种子采自于河南省济源市冬凌草规范化种植基地,采集时间为2011年11月,经河南中医学董诚明教授鉴定为唇形科碎米桠 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 种子。选取种皮上具花纹的冬凌草种子,自来水漂洗干净后放入75%乙醇中

消毒30 s,之后用0.1%氯化汞溶液振荡消毒8 min,无菌水冲洗5次后,于超净工作台上将接种于1/2 MS培养基上,无菌条件下培养,培养约30 d后的无菌苗备用。

2 方法

2.1 培养物培养 将无菌苗叶片,切成0.5 cm × 0.5 cm大小,接种于MS + 6-BA 2.0 mg·L⁻¹ + NAA 1.0 mg·L⁻¹培养基上(pH 5.8),诱导愈伤组织的形成。将上述诱导的愈伤组织,接种于MS + 6-BA 2.0 mg·L⁻¹培养基上(pH 5.8)上,诱导芽的分化。

2.2 取样时期的确定 根据培养物形态的变化,确定取样时期(表1)。

表1 不同取样时期培养物的形态特征

No.	取样时期	培养物形态特征
1	外植体	无菌苗叶片
2	诱导3 d	叶片中部隆起,体积增大
3	叶片边缘形成愈伤	外植体周围布满愈伤,颜色为黄绿色
4	完全形成愈伤	外植体全部愈伤化,颜色为淡绿色
5	愈伤增殖(10 d)	颜色淡绿色,质地松软
6	愈伤增殖(20 d)	颜色深绿色,质地较硬
7	分化培养7 d	愈伤颜色中间逐渐变浅,周围黄绿色
8	分化培养15 d	愈伤周围似有绿色芽点出现
9	分化培养21 d	愈伤周围为绿色扁平叶状体

2.3 冬凌草甲素含量的测定 参照2010年版《中国药典》一部^[13]。

2.4 石蜡切片的制作 样品在FAA固定液中固定后,先后经过系列乙醇脱水、透明、透蜡、包埋、切片、贴片、染色、封片等,最后在莱卡DM-3000型显微镜下进行观察,拍照。

2.5 透射电镜制作 样品经戊二醛-锇酸双重固定后,先后经过系列丙酮脱水、环氧树脂812包埋、超薄切片、饱和醋酸铀染色等,最后采用日立H-7500型透射电子显微镜下进行观察和照相。

3 结果与分析

3.1 离体培养条件下冬凌草甲素的积累动态 离体培养过程中冬凌草甲素表现出有-无-有的规律性。外植体中(无菌苗叶片)冬凌草甲素含量最高为0.89%;离体培养3 d,叶片中部隆起时,冬凌草甲素含量下降为0.68%;当外植体边缘形成黄绿色愈伤时,冬凌草甲素的含量下降为0.45%;继续离体培养,外植体全部被淡绿色的愈伤组织覆盖,及愈伤增殖培养期间,冬凌草甲素的含量下降为0,分化培养7 d时,培养物中冬凌草甲素含量依然为0,分

化培养 15 d,愈伤周围似有芽点显现时,冬凌草甲素开始积累,含量为 0.059 3%,分化培养 21 d,愈伤周围出现扁平叶状体时,冬凌草甲素的含量上升为 0.064 8%,见表 2。

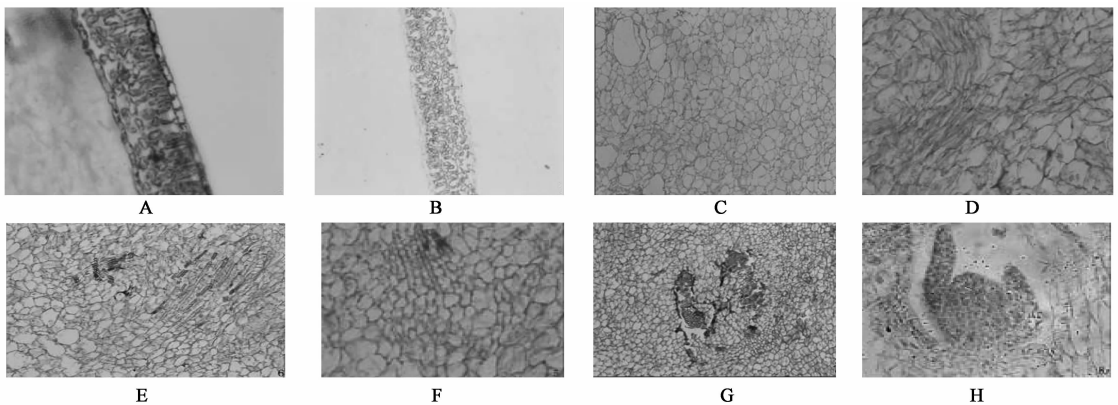
表 2 培养物中冬凌草甲素积累动态

培养时期	冬凌草甲素含量/%
外植体(无菌苗叶片)	0.89
离体培养 3 d	0.68
叶片边缘形成愈伤	0.45
完全形成愈伤组织	0
愈伤增殖期间	0
分化培养 7 d	0
分化培养 15 d	0.059 3
分化培养 21 d	0.064 8

3.2 离体培养条件下培养物组织结构的变化 外植体(无菌苗叶片)时期,无菌苗叶片由表皮、栅栏组织、海绵组织三部分组成。表皮细胞一层,排列紧密,无细胞间隙;栅栏组织细胞呈长圆柱形,海绵组

织排列疏松,细胞间隙较为发达(图 1A),此时冬凌草甲素含量最高。而诱导 3 d 后,叶片中部隆起,栅栏组织与海绵组织区分不明显,细胞的排列呈现无序、杂乱状态,表明叶肉细胞开始脱分化(图 1B),此时冬凌草甲素的含量也开始下降。当外植体周围形成黄绿色愈伤组织时,冬凌草甲素含量急剧下降,显微观察发现,培养物内全部为椭圆形、圆球形、不规则形的薄壁细胞,且在愈伤组织增殖过程中未见细胞形状的变化(图 1C)。

当愈伤组织分化 7 d 时,培养物内部分椭圆形、圆球形、不规则形的薄壁细胞逐渐变为长扁平状(图 1D),表明培养物内的部分薄壁细胞开始再分化,此时培养物内仍未检测到冬凌草甲素。当细胞分化 15 d 时,培养物内出现了导管的分化(图 1E,F),同时愈伤周围似有绿色芽点出现,此时,冬凌草甲素已经开始积累。分化培养 21 d 后,愈伤周围出现扁平叶状体,此时冬凌草甲素含量增加,显微切片显示培养物内部已有维管束及芽原基的形成(图 1G,H)。



A. 外植体(无菌苗叶片);B. 诱导 3 d 后的外植体;C. 愈伤组织时期培养物内部结构;D. 愈伤组织分化 7 d 时薄壁细胞开始再分化;E. 细胞分化 15 d 后培养物内部结构(导管分化);F. 细胞分化 15 d 后培养物内部结构(导管分化);G. 分化 21 d 时培养物内部结构(示维管组织);H. 分化 21 d 时培养物内部结构(示芽原基)

图 1 离体培养条件下培养物中显微结构变化

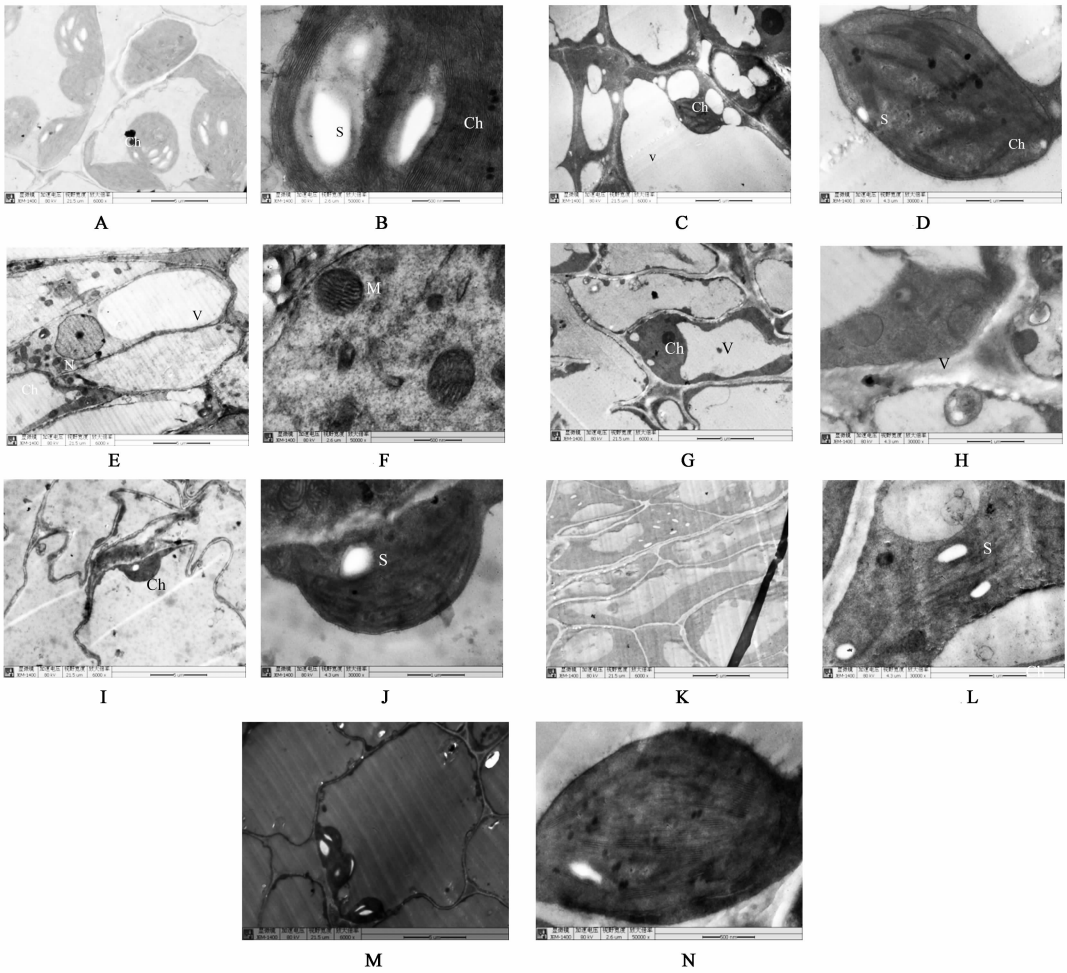
3.3 离体培养条件下培养物超微结构的变化 由图 2A,B 可知,叶肉细胞中含有较多的叶绿体,叶绿体基质片层沿叶绿体长轴方向排列,清晰可见,部分叶绿体内含有较多的淀粉粒,此时冬凌草甲素含量较高。当叶片中部隆起时,培养物细胞中液泡大量出现,叶绿体及其内淀粉粒数目变少(图 2C,D)。当叶片周围出现黄绿色愈伤后,细胞代谢活动旺盛,超微结构显示培养物细胞中细胞核清晰可见并出现被膜完整、嵴非常明显的线粒体(图 2E,F)。此时冬凌草甲素含量急剧下降。当外植体完全被愈伤组织覆盖时,冬凌草甲素含量降为 0,此时极少观察到

叶绿体(图 2G,H)。

分化 7 d 后的愈伤,再次观察到叶绿体出现,此时冬凌草甲素含量仍然为 0(图 2I,J)。分化 15 d 后的培养物中叶绿体及其内淀粉粒的数目再次增多(图 2K,L),此时冬凌草甲素开始积累。愈伤分化 21 d 后,几乎在所有的叶绿体上面均能看到淀粉粒(图 2M,N),此时冬凌草甲素含量逐渐增加。

4 讨论

随着叶片外植体的脱分化,培养物内叶绿体数目逐渐减少,冬凌草甲素的含量也随之逐渐降低,当冬凌草甲素再次积累时,培养物内叶绿体数目再次



A. 外植体中的叶绿体及其内淀粉粒;B 淀粉粒;C. 诱导 3d 后培养物中的叶绿体;D. 诱导 3 d 后培养物中叶绿体;
 E. 叶片周围形成愈伤时超微结构;F. 叶片周围形成愈伤时超微结构;G. 愈伤组织时期的超微结构;H. 愈伤组织时期的超微结构;
 I. 愈伤组织分化 7 d 时的超微结构;J. 愈伤组织分化 7 d 时的叶绿体;K. 愈伤组织分化 15 d 时的超微结构;
 L. 愈伤组织分化 15 d 叶绿体及其内淀粉粒;M. 愈伤组织分化 21 d 时的超微结构;N. 愈伤组织分化 21 d 时的叶绿体;

Ch-叶绿体;S-淀粉粒;M-线粒体;N-细胞核;V-液泡

图 2 离体培养条件下培养物超微结构的变化

增多。该现象的原因可能与冬凌草甲素在培养物内的生物合成有关。因冬凌草甲素属于二萜类化合物,这类化合物来自于质体的 MEP(丙酮酸/磷酸甘油醛)途径,而丙酮酸为该途径的主要原料之一,且其来源途径之一为光合产物-葡萄糖的代谢。而与光合作用有关的细胞器为植物体内叶绿体,该细胞器主含色素为叶绿素及胡萝卜素,其数目的多少可能与植物体内叶绿素含量的高低呈正相关,这一点在烟草上已有证明^[14],而叶绿素含量的高低又与培养物光合速率的大小及其光合产物葡萄糖含量高低有关,最终影响了丙酮酸的含量,从而使得培养物内叶绿体数目的多少与冬凌草甲素含量有着一定的关系,并且前期研究也证明了叶绿素含量的高低与冬凌草甲素含量呈正相关^[15],与本研究再

次吻合。

此外,叶绿体产生的同化产物一部分转运到叶绿体外,一部分以淀粉粒的形式储藏起来,故无菌苗叶片中冬凌草甲素含量较高,且在叶绿体内观察到较多的淀粉粒。当培养物内冬凌草甲素含量下降为 0 时,叶绿体数目明显减少。当冬凌草甲素再次积累合成时,在培养物内叶绿体数目增加的同时,出现了维管组织的分化。维管组织的出现使得培养物输导水分、无机盐、同化产物能力的加强,进一步加速了培养物产生次生代谢产物的能力,并且随着冬凌草甲素含量的提高,芽原基分化明显,特别是扁平叶状体的出现使得培养物光合能力进一步提高,从而冬凌草甲素含量也逐渐升高。

[参考文献]

- [1] 鹏蕾. 冬凌草甲素对人肺腺癌 SPC-A-1 细胞的抑制作用及其机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
- [2] 孙汉董, 林中文, 傅坚, 等. 信阳冬凌草甲素和乙素的结构研究[J]. 化学学报, 1985, 13(43): 353.
- [3] 李吉学, 李燕杰, 陈百泉. 冬凌草甲素提取纯化方法[J]. 河南大学学报: 医学版, 2010(1): 10.
- [4] 杨中汉, 田京城. 冬凌草叶中冬凌草甲、乙素的含量测定[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2005, 26(4): 53.
- [5] 车宪平, 韩瑞发, 肖劲逐, 等. 冬凌草甲素对人膀胱癌细胞株 B I U-8 7 的生长抑制作用及机制探讨[J]. 山东医药, 2009, 49(46): 4.
- [6] 徐莉莉, 聂世现, 黄文静. 冬凌草组织培养及其愈伤组织诱导研究[J]. 生物学杂志, 2010, 27(3): 24.
- [7] 董诚明, 苏秀红, 王伟丽. 氮碳源对冬凌草再生植株生长及次生代谢产物的影响[J]. 西北植物学报, 2009, 29(3): 494.
- [8] 苏秀红, 董诚明, 王春雷. 冬凌草离体培养体系的建立及主要次生代谢产物的测定[J]. 西北植物学报, 2008, 28(2): 310.
- [9] 刘晨, 李冬杰, 李楠, 等. 稀土元素对冬凌草细胞合成冬凌草甲素的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(13): 5965
- [10] Sharada M, Ahuja A, Asuri K, et al. Withanolide production by *in vitro* cultures of *Withania somnifera* and its association with differentiation [J]. *Biologia Plantarum*, 2007, 51(1): 161.
- [11] M, Sellés, F, Viladomat, J, Bastida, et al. Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus*: correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids[J]. *Plant Cell Reports*, 1999, 18: 646.
- [12] 张泓. 植物培养细胞的形态分化与次生代谢产物的生产[J]. 植物学通报, 1994, 11(1): 12.
- [13] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [14] 黄勇, 周冀衡, 杨虹琦, 等. 烤烟成熟过程中叶片和叶绿体的细胞学观察[J]. 作物学报, 2006, 32(11): 1767.
- [15] 苏秀红, 史应强, 董诚明, 等. 冬凌草植株再生过程中冬凌草甲素的积累机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 104.

[责任编辑 邹晓翠]

欢迎订阅 2014 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。1994 年创刊, 2002 年, 被中国科学技术信息研究所的“中国科技论文统计源期刊”收录, 成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升, 已相继被《中国科学引文数据库》、波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等知名检索系统收录。

本刊是中医药行业一本独具特色的学术期刊, 其内容较全面地反映了我国中医药发展水平。主要栏目有: 中医动态、专题论坛、改革与管理、中医药信息学、流行病学调查、临床论著、实验研究、中药研究与开发、临床报道、专家经验、临证心得、思路与方法、中医教育、医院药学、综述等。

本刊为月刊, 大 16 开国际开本, 136 页, 国内外公开发售, 每册定价 10 元, 全年 120 元。国内邮发代号: 82-670; 国外代号: M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址: 北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部, 邮编: 100700, 电话: 010-64014411-3278, E-mail: Lxx@mail.cintcm.ac.cn。