

文章编号: 1000-4025(2002)01-0069-05

光照对水母雪莲愈伤组织合成生物碱的影响*

王慧春, 李毅*, 王环, 徐文华, 王莉, 张宝琛

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

摘要: 以水母雪莲 (*Saussurea medusa* Maxim.) 无菌幼苗的根作外植体, 诱导获得的愈伤组织为材料, 研究光照对生物碱合成的影响。结果表明: 尽管在水母雪莲的愈伤组织培养物中, 总生物碱的含量比原植株中的含量低, 但其组成成分比原植物丰富, 并且秋水仙碱的含量也比原植物高, 尤其是在光照培养的愈伤组织中秋水仙碱大大增加。

关键词: 水母雪莲; 愈伤组织; 生物碱; 秋水仙碱

中图分类号: Q 944.6 文献标识码: A

Effect of lighting on the biosynthesis of Alkaloid in the calli of *Saussurea medusa*

WANG Hui-chun, LI Yi, WANG Huan, XU Wen-hua, WANG Li, ZHANG Bao-chen

(The Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Science, Xining 810001, China)

Abstract: Effect of lighting on the Biosynthesis of Alkaloid in the calli from the explants of roots of *Saussurea medusa* Maxim, was investigated. The results showed that the content of total Alkaloid in cell culture was less than that of wild *Saussurea medusa* Maxim, but the elements of Alkaloid and the content of Colchicine in the former were more than that of the latter, especially lighting culture.

Key words: *Saussurea medusa* Maxim; callus; Alkaloid; Colchicine

水母雪莲 (*Saussurea medusa* Maxim.) 又称水母雪兔子, 藏名恰羔素巴, 系菊科 (Compositae) 凤毛菊属 (*Saussurea* DC.) 雪兔子亚属 (*Subgen. Eriocoryne*) 植物, 分布于我国青

* 收稿日期: 2000-11-27; 修改稿收到日期: 2001-03-01

基金项目: 中国科学院生物科学与生物技术研究特别支持费 (STZ-1-15) 及国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目

作者简介: 王慧春 (1974-), 女 (汉族), 在读硕士研究生。

* 通讯联系人。Correspondence to: LI Yi

海、甘肃、西藏等地,其原植株均可同等入药,是藏族常用的一种民间药材^[1-3],有“高原宝药”之称^[4]。

水母雪莲含有多种有效提取物,其中生物碱具有活血通络、抗癌、抗炎镇痛、解痉等功效,可治疗风湿性关节炎、心血管疾病及一些妇科病等^[5]。然而天然水母雪莲生长环境特异,仅生长于海拔3 500 m以上的高山流石滩上,而且自然生长缓慢,人工栽培困难,加之长期的掠夺性采挖,已使得水母雪莲成为濒危植物^[6,7]。应用植物细胞培养技术开发水母雪莲具有良好的应用前景,这为满足临床治疗对水母雪莲有效成分的需求和保护濒危物种均具有重要的意义。

本研究对水母雪莲细胞培养物与原植株中生物碱组成成分及含量进行了比较分析,重点研究了光照条件对水母雪莲愈伤组织合成生物碱的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

原植株采自青海省玉树州,用全草。

用水母雪莲无菌幼苗的根作外植体,在附加NAA 0.2 mg/L、2,4-D 2 mg/L、pH 5.8的MS固体培养基上诱导愈伤组织,诱导温度为 20 ± 1 ,并进行了继代培养。

1.2 培养方法

在100 mL三角瓶内装20 mL固体培养基,每瓶接种量为鲜重0.1 g,培养温度为 20 ± 1 ,每隔20 d继代1次,光照条件为40 W白色荧光灯连续光照,辐照强度为 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。所得培养物在60 °C条件下烘干,磨碎待用。暗培养的方法除不加光照外,其余条件与光照培养相同。两种培养方式同时进行。

1.3 生物碱含量的测定

1.3.1 样品提取 取样品粉末(干)约2.0~3.0 g,精密称定,置具塞三角瓶中,具体提取方法参照《中华人民共和国药典》一部(1990年版)^[8]。最后收集氯仿液,此为生物碱提取液。

1.3.2 中和滴定法测定总生物碱含量 精密吸取提取液10 mL置100 mL三角瓶中,具体方法参照《中华人民共和国药典》一部(1990年版)^[8],记录所消耗的碱液毫升数。同时与样品一起作空白,空白所消耗的碱液数与样品所消耗的碱液数之差即为生物碱所消耗的酸液。实验重复3次*。

1.3.3 HPLC法测定秋水仙碱含量 (1)色谱条件: 仪器: HP1100 高效液相色谱仪; 色谱柱: Kromasil C18(150 mm × 4.6 mm); 流动相: 甲醇-水=59:41(含2 mmol/L NaAc, 0.02% 二乙胺, 0.3% 四氢喹啉,用HAc调其pH为6.0); 流速: 0.8 mL/min; 检测器: DAD 二极管阵列检测器; 检测波长: 245 nm; 柱温: 室温。(2)样品溶液的制备。按1.3.1的方法提取样品,水浴蒸干氯仿液,残渣用5 mL甲醇充分溶解并摇匀,取上清液2 μL 进样。测定各生物碱的峰面积,与标准品数据对照,确定秋水仙碱含量,测定值(μg)由线性回归方程得到。秋水仙碱量=测定值 × 甲醇溶液5 μL /进样量2 μL ,秋水仙

* 雪莲中生物碱的分子量以秋水仙碱($M = 399.44$)为标准,然后算出百分含量。

碱的百分含量=秋水仙碱量/样品量×100%。所有数据为3次重复的平均值。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织培养物与原植物中的生物碱含量比较

在相同条件下,用中和滴定法测定水母雪莲原植株、培养物总生物碱的含量,结果见表1。由表1知,水母雪莲光、暗培养物中总生物碱含量较原植株中低,分别是原植株总生物碱含量的83.552%、60.962%。

表1 水母雪莲原植株、培养物中总生物碱含量的比较

Table 1 Comparison of content of total Alkaloid in wild plant and culture

项目 Item	样品量 Weight (g)	NaOH ⁺ 滴定 Titration with NaOH (mL)	与空白差 Differ from blank (mL)	相当于秋水仙碱 Relative to colchicine (mg)	含量 Content (%)
原植株 Wild plant	0.501 ± 0.132	33.18 ± 2.94	0.73 ± 0.219	1.709 ± 0.123	0.341 ± 0.034
光照培养物 Light culture	0.837 ± 0.234	32.89 ± 2.78	1.02 ± 0.342	2.388 ± 0.193	0.285 ± 0.022
暗培养物 Dark culture	0.821 ± 0.218	33.18 ± 3.12	0.73 ± 0.132	1.709 ± 0.132	0.208 ± 0.021
空白 Blank		33.91 ± 3.92			

注: * NaOH 浓度为 0.00586 mol/L。Note: * NaOH concentration is 0.00586 mol/L.

2.2 光照条件对愈伤组织中生物碱的组成及秋水仙碱含量的影响

在相同条件下,用HPLC测定水母雪莲原植株、培养物的秋水仙碱含量,结果见图1~3*。

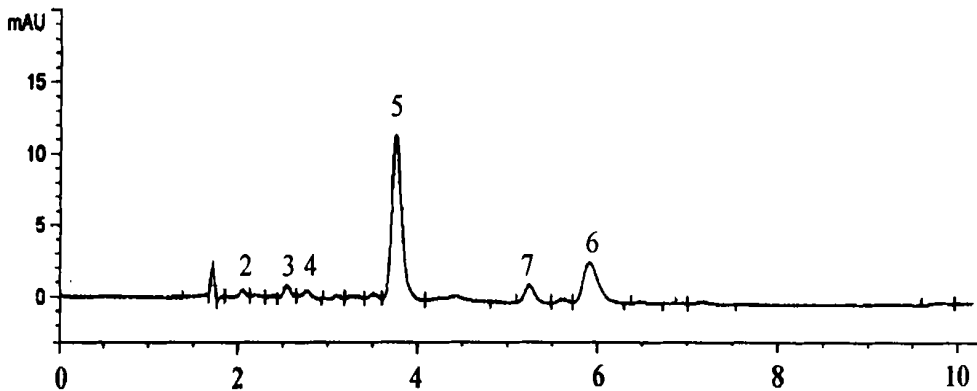


图1 原植株的HPLC图谱

Fig. 1 Atlas of HPLC of wild plant

在图1中,共出现了7个峰,其中1、5、6峰比较明显,尤其是第5峰最明显。

* 在3个图谱中,凡是保留值基本一致的峰,都标有同一数字;与标准品数据对照,标有“5”的峰即为秋水仙碱。

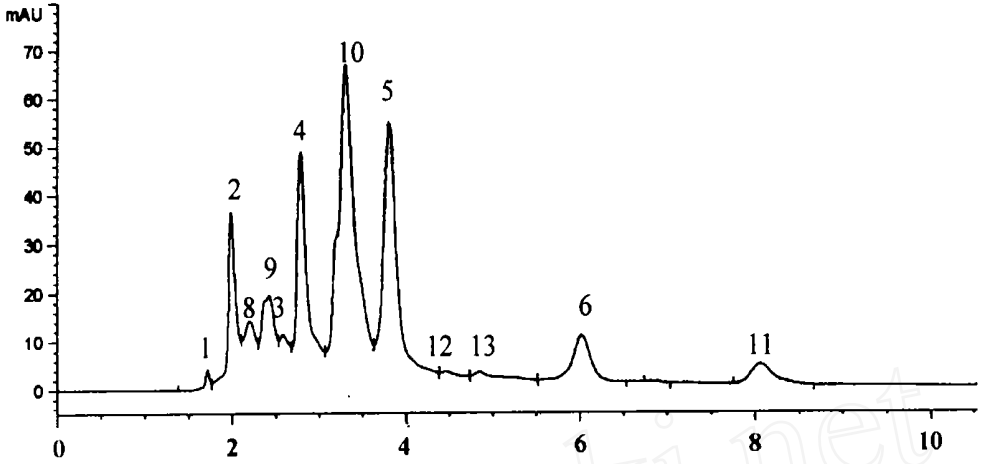


图2 光照培养物的HPLC图谱

Fig 2 Atlas of HPLC of lighting culture

在图2中,出现了1~6、8~13共12个峰,其中1~6、8~11峰比较明显,尤其是2、4、5、10峰特别明显。与图1相比可得出: 峰的个数有所增加,除7峰之外,几乎包含了图1中所有的峰; 在1~5峰之间,出现的峰比较多; 相应峰的峰面积普遍比较高; 第10峰的峰面积高于第5峰的峰面积。

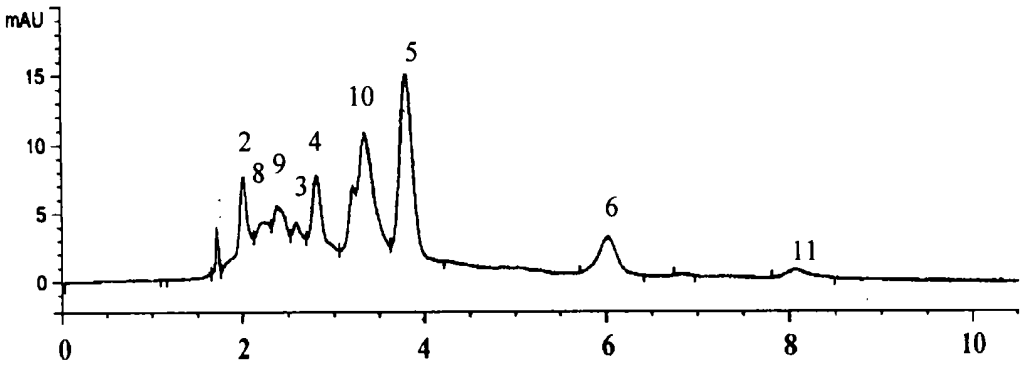


图3 暗培养物的HPLC图谱

Fig 3 Atlas of HPLC of darking culture

在图3中,出现了1~6、8~11共10个峰,除第11峰之外,其余峰都比较明显。与图1相比,相同之处是: 在所有峰中第5峰的峰面积最高; 不同之处与上述、和的结果相同。与图2相比可得知: 峰的个数不多; 在1~5之间,峰形比较复杂; 相应峰的峰面积不高; 第5峰的峰面积比第10峰的峰面积高。

秋水仙碱含量情况列于表2。

综上所述,水母雪莲细胞培养不仅有利于生物碱组分的增加,还有利于秋水仙碱含量的提高,尤其是光照培养结果更为明显。

表 2 水母雪莲原植株与培养物秋水仙碱含量的比较

Table 2 Comparison of content of Colchicine in wild plant and culture

项目 Item	样品量 Weight (g)	测定值 Value of detection (mg)	秋水仙碱量 Capacity of colchicine (mg)	秋水仙碱的 百分含量 Content of colchicine(%)
原植株 Wild plant	2 005 ± 0 213	0 014 ± 0 003	0 034 ± 0 002	0 0017 ± 0 0001
光照培养物 Light culture	2 343 ± 0 245	0 124 ± 0 017	0 309 ± 0 014	0 0132 ± 0 0007
暗培养物 Dark culture	2 818 ± 2 319	0 025 ± 0 009	0 062 ± 0 003	0 0022 ± 0 0001

3 讨 论

芮和恺等^[9]在黄连组织培养中通过薄层层析发现, 培养物与原植株中的次生产物并不完全一致。我们的试验结果也证明了这一点, 即原植株中存在的成分, 培养物中不一定产生, 如图 1 中的第 7 峰; 原植株中不存在的成分, 培养物中有可能产生, 如图 2、3 中的 8 ~ 13 峰。但总的来说, 培养物中主要还是产生原植株中所存在的成分。

李观海等^[10]曾报道, 雪莲中至少含有 4 种生物碱, 但其具体成分未见分析。陈金瑞等^[11]研究发现, 雪莲中含有秋水仙碱。本研究结果进一步表明, 在水母雪莲细胞培养物中, 秋水仙碱的含量较原植株中的高。

对于高等植物细胞大量培养生产有用代谢产物来说, 光照条件是一个很重要的物理因子^[12]。据 Butcher^[13]报道, 光影响着植物体内酶的活性和次生代谢产物的积累, 照光处理得当, 可收到显著的效果。赵德修等^[14]曾报道, 光能诱导水母雪莲中黄酮类化合物的合成。我们的试验结果表明, 在水母雪莲培养物中, 尽管总生物碱的含量较原植株中低, 但有些生物碱的含量却比原植株中高, 这在光照培养物中尤为明显。

致谢: 本文得到杨正本、孙洪发老师的指正, 谨致谢忱!

参考文献

- [1] 连文琰 雪莲花原植物的调查整理[J]. 中药材, 1985, 6: 19
- [2] 赵德修 水母雪莲的细胞培养和高产黄酮细胞系的筛选[J]. 植物学报, 1998, 40: 515-520
- [3] 中国科学院西北高原生物研究所编 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 222
- [4] 郑尚珍 雪兔子的挥发油和微量元素成分的研究[J]. 中国药学杂志, 1991, 26(9): 526-529
- [5] 赵德修 雪莲花的研究进展[J]. 中草药, 1996, 27(6): 372-374
- [6] 国家环境保护局, 中国科学院植物研究所 中国珍稀濒危保护植物名录(第一册)[M]. 北京: 科学出版社, 1987
- [7] 李茂寅 水母雪莲愈伤组织培养和黄酮类化合物的形成[J]. 云南植物研究, 2000, 22(1): 65-70
- [8] 中华人民共和国卫生部药典委员会编 中华人民共和国药典[M]. 1990
- [9] 芮和恺 黄连的组织培养 I 愈伤组织诱导及小檗碱含量测定[J]. 中药材, 1990, 13(3): 3-6
- [10] 李观海 雪莲的药理作用研究[J]. 新疆医学院学报, 1979, 2: 63-68
- [11] 陈金瑞 藏药雪莲花的化学成分[J]. 云南植物研究, 1989, 11(3): 271-275
- [12] 倪德祥 光在植物组织培养中的调控作用[J]. 自然杂志, 1986, 9(3): 193-198
- [13] BUTCHER D N. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture[M]. Reinert J., Bajaj Y. P. S. ed., Springer-Verlag, 1977: 668
- [14] 赵德修 光质、光强和光期对水母雪莲愈伤组织生长和黄酮生物合成的影响[J]. 植物生理学报, 1999, 25(2): 127-132
- [15] 侯高生 植物细胞培养生产次生代谢物新进展[J]. 植物学通报, 1991, 8(3): 30-33