

药用植物培养高产细胞系的选育^{*}

□郭肖红 高文远^{**} 陈海霞 (天津大学药物科学与技术学院 天津 300072)
肖培根 (中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100094)
中国协和医科大学

摘要:通过植物发酵培养获得有用的药用植物次生代谢物是解决药用植物资源问题的有效手段。然而,大多数有用的次生物质在植物细胞中含量极低。为此,在工业化生产中首先需要适时地对植物细胞进行选育和改良,以解决提高植物细胞中次生物质含量问题。本文对药用植物培养高产细胞系选育方法和研究作了概述,针对高产细胞系筛选、诱变育种和基因转移关键共性技术研究及对解决高产细胞系不稳定性问题进行了讨论。

关键词:药用植物 高产细胞系 选育

一、引言

自20世纪80年代开始,由于“回归大自然”思潮的影响,天然药用植物资源的开发和利用受到世界各国的广泛关注。药用植物是我国传统中药的主要组成部分,约有5000多种,其中有些是我国特有的种属,如银杏、杜仲等。由于其生长、分布受气候、土壤和病虫害等因素的影响,生产受到一定的限制,加上人类对自然的过度开发,资源受到破坏,造成许多品种供不应求。通过植物发酵培养生产有用的药用植物次生代谢物是解决药用植物资源问题的途径之一。

到目前为止,通过植物细胞发酵工程研究过的植物超过400种,从培养细胞中分离到的次级代谢

产品在600种以上,其中60多种植物代谢物含量超过或等于原植物的含量。紫草(*Lithospermum croceum*)、人参(*Panax ginseng*)、老鹳草(*Geranium wilfordii*)的细胞发酵工程已实现商品化生产;黄连(*Coptis japonica*)、长春花(*Catharanthus roseus*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、毛地黄(*Digitalis lanata*)等的细胞发酵工程已实现工业化生产;一批植物如三分三(*Anisodus acutangulus*)、红花(*Carthamus tinctorius*)等的细胞发酵工程的研究,已达到中试水平^[1],更大一批植物发酵工程的研究正向中间试验过渡。这些事实说明通过植物细胞发酵培养产生有用的次生代谢产物越来越显示出巨大的应用潜力。

由于大多数有用的次生物质在植物细胞中含量极低,要将其用于工业化生产,首要条件是提高次生物质在细胞中的含量。为此,需要适时地对植物

收稿日期:2004-11-08

修回日期:2004-12-20

^{*} 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项(04-05ZP10):大宗根类药材再生根工业化培养关键技术的研究,负责人:高文远。

^{**} 联系人:高文远,教授,博士生导师,天津大学药物科学与技术学院中药系主任,Tel: 022-87401895, E-mail: pharmgao@tju.edu.cn。

60 [World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica]

细胞进行选育与改良,从中选育出优良的植物细胞。主要的解决途径包括筛选高产的细胞系、利用物理或化学诱变剂来促进次生物质的合成及植物细胞的基因转移等。

二、筛选高产的细胞系

获得高产稳产的细胞系是植物细胞大量培养产生有用的次生代谢物并实现工业化生产的关键之一。从外植体分离得到的植物细胞存在极大的异质性及变异性,植物在繁殖过程中雌雄配子之间的随机组合,形成了众多的基因型,这为高产细胞系的选育提供了巨大的物质基础。1981年Larkin等^[2]把植物培养细胞存在的变异性定义为“体外克隆变异”(somaclonal variation)。同一种类不同个体、不同部位的外植体诱导的愈伤组织其生长特性和目的含量也显著不同^[3],因此利用培养细胞之间的变异,通过自然选择法选出生长速率快、目的产物含量高的细胞系是可能的。

对于一个具有高产性能的细胞系的从头筛选,除了整个过程中的培养条件因素外,还应具备的因素有:足够的变异源细胞群;通过单细胞克隆技术使制备单细胞克隆成为可能;具有灵敏的、简单的分析产物的方法;能进行细胞系稳定性实验。到目前为止,已在很多植物培养细胞中通过不同的筛选方法获得了很多具有高产次级代谢特性的细胞系。

1. 按仪器不同有如下筛选方法

(1) 目视法。

由于色素的变异通常在愈伤组织和悬浮培养细胞中就表现出来,因而目视法对含色素的株系筛选具有通用性,如花青素、萘醌、类胡萝卜素、叶绿素和Betalains等。

Koblitz等在培养小果博落回(*Macleaya microcarpa*)细胞时发现,细胞的生物碱含量与黄色色素的形成成正比,以此为标记,从中筛选出了含量为0.4%的前鸦片碱(Protopine)和别隐品碱(Allo cryptotine)的高产系。Yamakawa等用此法通过不断重复选择葡萄(*Vitis vinifera*)愈伤组织,得到了含花青素1%~1.8%的高产系,而从喂饲层中获得

的单克隆色素含量高达3.4%。

紫草细胞能产生萘醌色素紫草素。Tabata等从紫草实生苗建立的45个培养系中,通过不断重复筛选至22代时,得到了一个含50~1200mg·g⁻¹鲜重的培养细胞系。他们利用原生质体克隆,发现在48个系中有15个系产生的紫草素比亲本高,最高含量比亲本高2倍。Fujita等已利用所获得的细胞系进行大量商品化生产紫草素。

当产物具荧光特征时,用目视法筛选就不需要培养物本身颜色来体现。Sasse等用紫外光(UV)筛选骆驼蓬(*Peganum harmala*)的愈伤组织,通过不断荧光斑点法筛选,获得了哈尔满生物碱比亲本高10倍的细胞系^[4]。

(2) 放射免疫法(RIA)。

该方法可以认为是最敏感和最精确的方法。通过比较一个未知的、没有标记的抗原对放射性标记抗原与特定抗体结合的抑制效应和已知标准物的抑制效应,可以从无数微量细胞样品中迅速地定量测定特殊成分。但由于仪器贵、合成放射性标记抗原困难、安全性差等原因,只在少数实验室使用。1977年,Zenk等首次建立和使用半自动RIA技术,对长春花细胞产生有用生物碱和高产系进行了精细的研究,他们成功分离的高产克隆在液体生产培养基中的生物碱总量达1.3%干重,比原植物高1.5倍。此法仅需0.1ml的粗提液(单细胞水平)即可,每天能处理200个样品,并且特异性极高^[4]。

(3) 酶联免疫法(ELIA)。

一种结合抗原抗体反应特异性和酶与底物反应的特异性和敏感性,利用酶联免疫法诊断试剂盒的免疫分析技术。该方法测定方便、快速、灵敏,可以取得同RIA法一样灵敏的结果,在大规模筛选中前景广阔。Robin应用此技术进行美洲苦木(*Picrasma quassioides*)细胞中苦木素的含量测定及高产细胞系的筛选,并指出此法能检测低至每0.1ml样品仅有5pg的物质^[4]。

(4) 流动细胞测定法(Flow cytometry)。

该方法局限于被测定细胞中次生产物在激光处理后能发出荧光的一类化合物,培养物的细胞能通过

流动分类器(flow sorter)并使细胞所含某成分的荧光在所设计的波长下加强。此方法仅需唯一的细胞单位作为筛选目标,因此认为原生质体是最合适的供试材料。Adams 设计了一套流动细胞测定仪,成功地筛选了万寿菊(*Tagetes erecta*)高含量噻吩细胞系^[4]。

(5) 琼脂小块法。

该方法限于测定抑菌作用的次生化合物高产细胞系的筛选,且需要选择一种特异敏感菌株。Suzuki 利用此法选择了欧亚唐松草(*Thalictrum aquilegifolium*)高产小檗碱细胞系^[5]。

(6) 细胞压榨法(cell squash method)。

Ogino 等把少量烟草愈伤组织放于滤纸上并用两块玻璃板压榨,细胞汁液被滤纸吸收,然后用 Dragendorff 试剂喷雾,从颜色反应中可以半定量地估计样品中尼古丁的含量,用此法测定了 1000 个克隆,在进行两次再克隆后,分离到了 5 个高产系,产量达 2.5%^[4]。

此外, Tam 等利用 TLC 鉴别罂粟(*Papaver somniferum*)中可待因的高产细胞系。Matsumoto 和 Macek 等利用 HPLC 分别测定了烟草和澳洲茄(*Solanum aviculare*)中泛醌-10 和茄解定的高产细胞系及 Nish 等利用生物试法从黄槿(*Phellodendron amurense*)中筛选出高产小檗碱($26 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 鲜重)细胞系^[4]。

2. 按培养系统不同所列筛选方法

用于选择高产系的培养系统有小细胞团培养(愈伤组织培养和细胞悬浮培养)和单细胞培养(平板培养和原生质体培养)。对每一个筛选目标选择合适的培养方法是重要的,这样可以使群体之间的变异性充分表现出来。

(1) 小细胞团培养。

愈伤组织培养是最容易、最简单的培养方法,也是其他两种培养方法的基础。但是由于愈伤组织细胞以团块存在,个体变异的细胞不易表现出来,因而它对于精确的选择来说亦是最受限制的方法。细胞悬浮培养与愈伤组织培养相比,悬浮培养物分散好,因而个体变异的细胞易表现出来。

目前,利用小细胞团培养筛选高产细胞系的例

子很多。杜金华等^[6]用小细胞团法筛选花青素的玫瑰茄(*Hibiscus sabdariffa*)细胞系,获得一株高产细胞,用其进行液体悬浮培养,花色苷含量和产量分别比对照提高了 14.5 倍和 16 倍。Harigae Yasushi 等^[6]用选择可见高产细胞团的方法,在 MS 培养基上挑选出了繁殖快的高产花青素葡萄细胞系,在 30 L 的小型发酵罐中培养,粗花青素产率为 0.3%。刘佳佳等^[7]以银杏(*Ginkgo biloba*)优良品种的种苗诱导愈伤组织,并采用缺氧胁迫小细胞团法从愈伤组织中筛选 6 个高产黄酮苷的细胞系,其中 TZG-1 黄酮苷含量达到细胞干重的 1.25%,比原来的愈伤组织提高了 257.1%。他们用此法还从愈伤组织中选育出 7 个高产悬浮细胞系,其合成银杏内酯的能力比选育前的愈伤组织有了显著提高,其中细胞系 MH-3 银杏内酯含量达到细胞干重的 0.048%,比选育前提高了 182.4%^[8]。

(2) 单细胞培养。

单细胞培养包括平板培养和原生质体培养。单细胞培养方法对筛选高产变异系是最精确的方法。因为这种方法可以培养从单细胞起源的培养物,所选择到的目标是同质的。这样不仅可以减少筛选时间,而且也利于选择系的稳定。利用单细胞培养方法进行高产变异系的筛选目前应用得最广泛,同时结果亦最丰富,研究也极为活跃。

植物单细胞平板培养技术即单细胞克隆技术是筛选高产细胞系的基础。用高产的植物品种和高产的植物器官或组织来诱导愈伤组织,通过细胞悬浮培养产生单细胞,然后利用单细胞平板培养技术和放射免疫测定法筛选出由单细胞产生的集落(克隆)。然而,这项技术还存在一些问题,正如该技术的创始人 Bergmann 指出:“在单细胞平板培养植物细胞时,诱导细胞分裂和集落形成方面,通常存在重大问题”^[9]。李景原等^[10]利用单细胞平板培养筛选商陆(*Phytolacca acinosa*)色素高产细胞株,试验表明细胞悬浮培养时间、培养方式和接种细胞密度等诸多因子都能影响植板率,培养基中是否有足够的对细胞生长和分裂有显著促进作用的活性成分即条件因子,对植物单细胞平板培养植板率有显著

影响。吴蕴祺等^[11]对不同来源的红豆杉(*Taxus chinensis*)的愈伤组织培养物进行比较、选择,获得生长较快、色泽不同的愈伤组织无性系,并利用平板培养和二分法继代培养,筛选得到一个 sinenxans 高产细胞系,其 sinenxans 含量达细胞干重的 4.0%。罗建平等^[12]培养人参细胞,经细胞平板克隆,获得近 300 个克隆细胞系,经连续继代培养,筛选得到寡糖素产率高且稳定的克隆系 PG-180,其寡糖素产率是原始株系的 2.32 倍。甘烦远等^[13]利用细胞平板培养技术同时结合紫外线诱变等方法,对红花 200 多个由单细胞或小细胞团发育而来的细胞克隆进行了筛选,经近 20 代继代培养观察后,从中筛选到一个合成 α -生育酚较稳定的高产克隆系(CT-289),其 α -生育酚平均含量为 $114.4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ DW,是原始株系的 7.2 倍。

原生质体培养在这方面的应用虽然大多数仍停留在基础研究阶段,但也已显示出一些颇有价值的初步结果。通过原生质体培养能得到单细胞衍生的体细胞克隆,这是药用植物筛选高产稳定细胞系的良好途径。自从 1960 年 Cooking 开创了植物原生质体培养的研究纪元以来,茄科中一些药用植物就开始作为模式系统来研究植物原生质体的培养和再生。目前,许多经济作物,尤其是重要的农作物的原生质体培养工作已广泛展开并取得了相当大的进展,相比之下药用植物方面相差尚远。由于药用植物种类繁多,更显得工作不足,我国药用植物的原生质体培养尚是一个有待开发的领域^[14]。Fujita 等^[15]利用原生质体培养,筛选出 15 个紫草宁高产细胞系,其最高活性为亲本的两倍,且在继代培养中稳定表达的所有植物体细胞都被认为是二倍体,但有些小片区域的细胞的染色体是二倍体的倍数。Sakamoto K. 等^[16]根据不发出荧光的产色素植物细胞的特性,成功地用细胞分拣器选出了产花色苷的土当归(*Aralia cordata*)培养细胞的原生质体。其原理是:将来自土当归的产花青素细胞与不产花青素细胞的混和物的原生质体用 0.2 ppm 荧光素 FITC 染色,然后在荧光显微镜下识别,肉眼可见不产花青素细胞的 FITC 发绿色荧光,产花青素的细胞的荧光完全

消失。用该法,他们肉眼检出了占总数 90% 的产花色苷的原生质体,活力达 60% ~ 70%。

三、诱变育种

诱变是获得优良高产细胞系的有效方法之一。诱变是指通过各种诱变剂的作用,使细胞发生变异的过程,分为物理诱变和化学诱变。利用培养细胞的自然变异性,从单细胞水平上筛选高产细胞系已有许多成功的尝试,而诱变处理可大大丰富细胞变异的程度。植物细胞在组织培养中,自发突变频率为 $10^{-6} \sim 10^{-7}$,诱变处理可使突变频率增大为 10^{-3} 。

1. 物理诱变

物理因子对次生物质合成影响极大,如光照可完全抑制紫草素和小檗碱的合成,激光和磁场处理均可提高紫草细胞中紫草素的含量,因此对物理因子的研究也很重要。

(1) 辐射诱变。

辐射诱变指用 X 射线、 γ 射线、中子、紫外线等使细胞发生变异的过程。辐射引起细胞分裂速度下降,从而使营养生长和愈伤组织生长缓慢。Balitc. L P 等^[17]对烟草不同倍性材料的辐射处理发现,辐射剂量达到植物和愈伤组织的敏感度时,出现抑制生长、再生能力下降和死亡三种情况。因此确定合适剂量是辐射诱变的关键。

γ -射线可引起细胞 DNA 的损伤,如造成单链或双链断裂、破坏核酸的碱基等,如受损严重,就可造成细胞死亡。细胞内含有的重接合酶可修复单链断裂的损伤,使细胞核酸代谢恢复正常,从而使细胞不致死亡^[18]。有工作表明,低剂量的 γ -射线对细胞的生长有促进作用^[19],具体原因尚不明了。许多次生代谢物被认为是在胁迫条件下形成的, γ -射线可能是作为一种胁迫因子而促进细胞产生次生物质。电离辐射可诱导产生大量自由基,自由基可造成组成生物膜的膜脂的过氧化,从而对生物膜造成破坏。也有认为自由基可使生物膜透性提高,同时激活依赖于 cAMP 的第二信使系统,进而促进细胞代谢。电离辐射能引起细胞突变,如引起染色体倍数的增加。因此 γ -射线对细胞次生物质含量的提高可

能是上述几种作用的综合表现^[20]。张华等^[21]研究 γ -射线对滇紫草(*Onosma paniculatum*)细胞产生色素的影响,确定了应用 γ -射线处理促进紫草素合成的最适辐射剂量为1500 R,处理后的细胞系在生产培养基上培养21d后紫草素含量(以干重计)达到 $94.79 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,较对照提高了144.6%。但是射线处理后的细胞系继代多次后,色素含量趋于下降,这可能是由于细胞分裂核细胞中的自由基清除系统的作用,而使受辐射产生的自由基逐渐减少造成的。将该细胞系以小团块选种法选种一次,从中筛选到了色素含量(以干重计)高达 $103.42 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的高产细胞系Mut-1,经继代后色素含量基本保持稳定。许明淑^[22]用不同剂量的 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线照射生长稳定的贯叶金丝桃(*Hypericum perforatum*)愈伤组织,发现贯叶金丝桃愈伤组织对 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线照射非常敏感,照射后第一代愈伤组织的细胞增大,生长量随之提高。肉眼观察贯叶金丝桃的生长,发现细胞的增殖很快,且细胞的生长状态显得旺盛。

紫外辐射可以使DNA分子上邻接的碱基形成二聚体,使DNA双链呈不正常的构型,通过倾向差错SOS修复系统使DNA继续复制,同时产生突变^[23]。紫外辐射也能诱发染色体畸变,罗建平等^[24]用不同剂量紫外辐射人参克隆细胞,并对寡糖素产率较高的克隆系连续10代继代培养,最后筛选到一株寡糖素产率很高的变异克隆系,其生长速率、寡糖素含量和产率分别是亲本的1.46倍、1.81倍和2.62倍。紫外线处理能够提高茶树培养细胞儿茶素等物质生物合成的能力,从而增加标记前体在儿茶素生物合成中的渗入率。成浩等^[25]利用紫外线预处理茶树继代培养的细胞,结果发现醇提取物儿茶素和原花色苷总量提高了约110%,HPLC分析表明乙酸乙酯萃取物中表儿茶素(L-EC)等成分有了大幅度提高,其中L-EC从对照的 $4.74 \text{ mg}/\text{瓶}$ 增加到 $6.9 \text{ mg}/\text{瓶}$,提高了45.6%。

(2) 激光诱变。

激光诱变是60年代初兴起的一种育种新手段,以后在水稻、豆类、花生等许多植物以及动物上都取得了重要的进展。有资料表明,自1972年以来,

共用14种激光器处理了40多种植物,育成了40多个新品种^[26]。激光可以造成生物体内DNA的直接损伤或诱发变异,从而增加了选择的机会。当激光作用于生物组织时,在波长、照射时间、能量密度、功率等参量中,照射时间是决定性参量。目前用于动植物诱变的激光类型有远红外 CO_2 、He-Ne、 Ar^+ 、 N_2 、红宝石和钕玻璃6种。

与射线诱变育种相比,激光诱变具有如下特点:①激光是一种受激跃迁辐射,具有能量密度高、单色性和方向性好等特点,与植物有机体的作用包括光效应、热效应、次生冲击波效应、电磁场效应及多光吸收非线性效应,较为复杂。②激光诱变的当代就能产生遗传性突变。而各种电离辐射第一代很少能产生遗传性变异,且突变多为隐性,只有在第二代同质结合情况下才可能表现出来。③激光辐照,不管何种剂量,当代成活株结实率均与对照接近。而电离辐射在半致死剂量照射下,当代成活株结实率一般在50%以下,所以激光诱变的半致死剂量不太明显。④激光辐照损伤具有修复作用。⑤激光诱变较电离辐射的当代植株形态变异不甚明显,诱变率小^[27]。

关于激光诱变的机理,Wolbarsht研究认为激光照射产生染色体畸变的可能原因是激光的发射光谱与DNA吸收光谱相接近时为DNA分子所吸收,这种光化反应过程造成细胞遗传损伤。另外,激光电磁波的直接作用或间接作用同样可以引起DNA分子中氢键的断裂,以致在细胞分裂时产生染色体畸变^[27]。郭斌等^[28]用He-Ne激光照射葡萄皮愈伤组织获得了高产白藜芦醇细胞系,其白藜芦醇平均产量比对照提高40%。李耀维等^[29]用He-Ne激光辐照雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)愈伤组织诱导突变,经初筛、复筛及突变株稳定性研究,筛选得到一株次生物质高产细胞系,其次生物质产量较对照提高45.2%,且遗传性状稳定。

2. 化学诱变

化学诱变剂种类较多,根据对DNA作用特点,主要分为三类:如5-溴尿嘧啶等碱基类似物在DNA复制时,诱发配对错误;链霉素C、马来酰肼(MH)等诱发染色体断裂;叠氮化物、烷化剂等改变

DNA 的化学结构。

罗建平等^[30]用 MNNG(N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍, N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanide)处理人参细胞悬浮培养物 1h, 得到一株稳定高产人参寡糖素优良克隆系 PGMB-37, 平均寡糖素含量和产率分别比亲本高 70% 和 156%。MNNG 是一种强作用的烷基化诱变剂, 对人参培养细胞的生长有很强的抑制作用。MNNG 处理悬浮细胞时, 外周细胞相对地受 MNNG 作用的浓度高且时间长, 使外周细胞生长受抑制甚至死亡, 细胞平板克隆后单个细胞或真正同源的小细胞团来源的克隆系增加, 因此用 MNNG 诱变处理后获得的变异克隆系在连续继代培养中有很好的稳定性。Furuya 等用亚硝基胍和 γ 射线处理人参愈伤组织, 得到了一个含粗皂苷 25.5% 的突变体。Nishi 等用化学诱变剂 MNNG 处理胡萝卜 (*Daucus carota*) 的细胞获得了很多变异克隆, 这些克隆的胡萝卜素含量比原来的细胞系高 3 倍, 比原植物根增加 4 倍。

四、植物细胞的基因转移

植物基因工程是在分子水平上进行基因重组与转移, 达到改良植物细胞、培育优良高产品种、提高植物细胞中次生代谢物含量的分子育种技术。植物细胞基因转移的方法主要有农杆菌介导法、直接转化法、基因枪法、电激法、显微注射法、脂质体介导法等。其中农杆菌介导法是目前广泛使用的植物细胞基因转移方法。

利用发根农杆菌转化植物细胞产生的发状根培养物具有生长速度快、合成次生代谢产物能力强、可将次生代谢产物分泌到培养基的特点。经发根农杆菌诱导产生的发根是单个转化细胞的克隆体, 而且培养的发根系间在生长速度及形态等方面存在着较明显的差异, 各无性系的特性十分稳定。发根的这种特点为植物发根无性系的选择提供了可行性。自 20 世纪 80 年代以来, 已经利用发状根培养生产了很多次生代谢产物。赵寿经等^[31]利用发根农杆菌 A4 菌株在人参根外植体上直接诱导产生发根, 培养生产人参皂苷, 筛选出高产发根系 R9923, 其人

参总皂苷含量达 $15.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

有些植物的活性成分仅在叶片或茎中合成, 不能用发状根培养获得这些成分, 可利用冠瘿瘤和畸状茎培养来达到目的。冠瘿瘤离体培养时, 具有激素自主性、增殖速率较常规细胞培养快等特点, 其次生代谢产物合成能力与稳定性强, 对生产有用次生代谢产物有良好的开发前景。宋经元等^[32]利用诱导的丹参 (*Salvia multiorrhiza*) 冠瘿瘤培养生产丹参酮, 筛选出高产细胞系, 丹参酮含量超过生药。Swapan 等^[33]用根癌农杆菌 C58 转化 *Coleus forskohlii* 形成冠瘿瘤, 并利用细胞克隆筛选到生长快、forskolin 含量高的细胞系 GSO-5/7, 培养 42d forskolin 含量达到 0.021%。

五、展望

药用植物组织培养及细胞培养在生物种植和生产技术方面是一个突破性进展, 在植物无性繁殖和次生代谢物生产方面开拓了一个广阔的天地, 使有用的次生代谢物达到或超过自然生长的原植物, 可以逐步过渡到工业化生产, 防止大量的采集而使药源枯竭。但是必须指出的是高产细胞系的不稳定性是阻碍向工业化生产的一个极大的问题, 因此必须寻找解决的方法。主要的解决方法包括从高产系中再不断克隆形成新的高产细胞系; 高产系出现不可逆的退化时, 干脆重新开始筛选, 尽量减少继代次数, 用矿物油包埋法、低温保存法 ($0 \sim 4^\circ\text{C}$) 和冰冻保存法 (-180°C)。除此之外, 在继代时应严格遵守一种已定的方案, 任何偏离都会使代谢物在质和量上发生显著变化。单纯的细胞培养不能解决获得某些重要药用有效成分的问题, 因而植物细胞培养和基因工程技术的成熟结合将为解决药用植物资源匮乏的问题提供一条途径, 为中药现代化作出贡献。

参考文献

- 1 于荣敏, 张惟材, 张辉. 中国药用植物细胞工程研究进展 (I). 沈阳药科大学学报, 1995, 12(1): 59 ~ 63.
- 2 Larkin P J, Scowcroft W R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures. Theor Appl Genet 1981, 60: 197 ~ 214.
- 3 Gibson D M, Ketchum R E, Vance N C. et al. Initiation and growth of

- cell lines of *Taxus Brevifolia* (Pacific New). Plant Cell Rep, 1993, 12: 479 ~ 482.
- 4 甘烦远, 郑光植. 植物培养细胞次级代谢产物高产细胞系的筛选. 国外医药. 植物药分册, 1990, 5(1): 10 ~ 14, 48.
 - 5 杜金华, 郭勇. 高产花色苷玫瑰茄细胞的筛选. 生物工程学报, 1997, 4: 437 ~ 439.
 - 6 Harigae Yasushi, chen, Wenpin et al. Shokuhin Sangyo Senta Gijutou Kenkyu Hokoku, 1991, 17: 79 ~ 88.
 - 7 刘佳佳, 郭勇, 郑穗平等. 缺氧胁迫小细胞团法选育高产黄酮苷悬浮细胞系. 中南工业大学学报, 2001, 32(1): 41 ~ 45.
 - 8 刘佳佳, 李晓如, 郭勇等. 缺氧胁迫法选育高产银杏内酯悬浮细胞系研究. 天然产物研究与开发. 2001, 18(2): 1 ~ 4.
 - 9 孙敬三等. 植物细胞工程实验技术. 北京: 科学出版社, 1995, 181 ~ 204.
 - 10 李景原, 王太霞, 杨相甫等. 商陆单细胞平板培养及色素高产细胞株的筛选. 天然产物研究与开发, 2000, 12(4): 62 ~ 65.
 - 11 吴蕴祺, 朱蔚华, 陆俭等. 红豆杉愈伤组织中 sinenxans 高产细胞系的选择及其培养. 中国药学杂志, 1998, 33(1): 15 ~ 18.
 - 12 罗建平, 郑光植, 甘烦远. 高产人参寡糖素培养细胞克隆系的筛选. 植物学报, 1994, 36(3): 209 ~ 214.
 - 13 甘烦远, 郑光植. 红花细胞培养中高产 α -生育酚克隆系的筛选. 云南植物研究, 1992, 14(3): 289 ~ 294.
 - 14 孙勇如, 安锡培. 植物原生质体培养. 北京: 科学出版社, 1991: 108 ~ 116.
 - 15 Fujita Y, Takahashi S, Yamada Y. Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives by protoplasts cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells. Agric Biol Chem, 1985, 49: 1755 ~ 1759.
 - 16 Sakamoto Kauso, Kumiko Lida et al. Planta Meel., 1994, 60(3): 253 ~ 259.
 - 17 Balite. L P, K Hattori. Effect of γ -rays on callus growth of *Nicotiana* species. Journal of Breeding, 1989, 39(1): 25 ~ 30.
 - 18 顾瑞琦. 辐射对植物细胞的伤害及其修复. 植物生理学通讯, 1981, (5): 1 ~ 6.
 - 19 郑光植, 何静波, 王世林. 药用植物组织培养的研究 V. 生长速率和东莨菪碱含量皆高而稳定的变异体. 植物生理学, 1983, 9(2): 129 ~ 134.
 - 20 林延安. 梯度磁场对农作物的增产效应及其激励. 核农学通报, 1990, 11(4): 189 ~ 190.
 - 21 张华, 曹日强, 杨永华. γ -射线对滇紫草细胞产生色素的影响. 植物资源与环境, 1990, 8(1): 42 ~ 45.
 - 22 许明淑. 贯叶金丝桃高产细胞系筛选的基础研究. 中国中医研究院硕士学位论文, 2000.
 - 23 Brash DE, Haseltine WA. UV induced mutation hotspots at DNA damage hotspots. Nature, 1982, 298: 189.
 - 24 罗建平, 郑光植, 甘烦远. 高产人参寡糖素培养细胞克隆系的诱变筛选. 植物生理学报, 1994, 20(4): 332 ~ 338.
 - 25 成浩, 李素芳, 沈星荣等. 利用茶树培养细胞合成 ^{14}C -儿茶素的研究. 核农学报, 2001, 15(1): 38 ~ 44.
 - 26 万贤国. 我国植物激光诱变育种的概况. 激光生物学报, 1996, 5(3): 865 ~ 869.
 - 27 王立秋, 杨国忠, 陈风德. 激光诱变的生物学效应及其在动植物遗传育种上的应用. 激光生物学报, 1997, 6(2): 1097 ~ 1102.
 - 28 郭斌, 尉亚辉, 曹炜. He-Ne 激光诱变选育高产白藜芦醇细胞系. 光子学报, 2002, 31(3): 277 ~ 280.
 - 29 李耀维, 冯文新, 武增寿等. 激光诱变选育雷公藤次生物质高产细胞系. 激光生物学报, 2000, 9(4): 281 ~ 284.
 - 30 罗建平, 郑光植. 高产人参寡糖素培养细胞变异克隆系的筛选. 云南植物研究, 1995, 17(1): 83 ~ 88.
 - 31 赵寿经, 李昌禹, 钱延春等. 人参发根的诱导及其适宜培养条件的研究. 生物工程学报, 2004, 20(2): 215 ~ 220.
 - 32 宋经元, 张荫麟, 祁建军等. 丹参冠瘿组织高产株系选择和丹参酮的产生. 生物工程学报, 1997, 13(3): 317 ~ 319.
 - 33 Swapna Mukherjee, Biswajit Ghosh, Sumita Jha. Establishment of forskolin yielding transformed cell suspension cultures of *Coleus forskohlii* as controlled by different factors. Journal of Biotechnology, 2000, 76: 73 ~ 81.

(责任编辑: 左 向)

(上接第 59 页)

- 4 孙秀梅, 张兆旺, 张学兰等. 四神茶剂 4 种提取方法的成分比较. 中国中药杂志, 1997, 22(6): 349 ~ 351.
- 5 张学兰, 张兆旺, 孙秀梅等. 四神茶剂 4 种提取方法的药效比较. 中国中药杂志, 1997, (增刊): 201 ~ 203.
- 6 张兆旺, 孙秀梅, 王蕾等. 麻杏石甘汤 2 种提取方法的成分比较. 中国中药杂志, 1997, 22(7): 413 ~ 415.
- 7 张兆旺, 王英姿. 当归苦参丸 2 种方法提取液的成分比较. 中国中药杂志, 1999, 24(12): 734 ~ 736.
- 8 孙秀梅, 张兆旺, 修彦凤. 参附汤 2 种方法提取液的成分比较. 中成药(电子版), 1999.
- 9 修彦凤, 孙秀梅, 张兆旺. 参附汤方药 4 种方法提取液的成分比较. 中成药, 2002, 33(8): 699 ~ 702.
- 10 吕青涛, 张兆旺, 孙秀梅等. 乙型肝炎颗粒剂 4 种方法提取液的成分比较. 中成药, 2000, 22(11): 752 ~ 756.
- 11 孙秀梅, 张兆旺, 张学兰等. 复壮胶囊方药 4 种方法提取液的成分比较. 中成药, 2001, 23(10): 703 ~ 706.
- 12 方杏春, 相秉仁, 安登魁. 裂解-高分辨气相色谱-模式识别技术在中药牡丹皮分析中的应用. 药学学报, 1990, 25(6): 462 ~ 468.
- 13 郭祖超. 医用数理统计方法. 北京: 人民卫生出版社, 1988.

(责任编辑: 刘维杰)

Establishment of A Platform for Study of Compound Drugs of Chinese Medicine by Method of Semi – bionic Extraction

Zhang Zhaowang and Sun Xiumei

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Jinan 250014)

The method of semi – bionic extraction (SBE) is a new technology of extraction, which is created, by the way of "gray thinking" to combine the method of study on the wholism of drugs with the method of study on the molecules of drugs and in view of existing "the theory of unique importance of medicinal components" and "the theory of general rules", especially for the preparations of Chinese medicine taken through digestive tract as considered from the viewpoint of bio – pharmaceutics. The result of study on quite a lot of Chinese drugs and their compounds shows that the SBE method may replace the method of water extraction (WE) and the method of semi – bionic alcohol extraction (SBAE) may replace the method of water alcohol extraction (WAE). Taking Huangliangjiedutang (Panax Notoginseng Detoxicating Liquid) and Cihangdan Pill for examples, this article describes the establishment of the technical platform for the study of the semi – bionic extraction of the compounds of Chinese drugs.

Key Words: Chinese medicine, compound drugs, semi – bionic extraction, technical platform, huangliangjiedutang, Cihangdan Pills

Breeding of High – yield Clones in Cultivation of Medicinal Plants

Guo Xiaohong, Gao Wenyuan and Chen Haixia

(School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072)

*Xiao Peigen (Institute of Medicinal Plants, Chinese Academy of Medical sciences and
China Union University of Medical sciences, Beijing 100094)*

It is an effective means to tap the resources of medicinal plants by the way of fermenting plants to obtain the secondary metabolites of useful medicinal plants. Nevertheless, most of useful secondary matters are extremely low in the cells of plants. For this reason, people have to first breed and improve the cells of plants in order to increase the content of secondary matters in industrialized production. This article summarizes the breeding methods and research of high – yield clones of medicinal plants and purposefully discusses the problems, such as the screening of high – yield clones, mutation breeding and gene transfer and the study of key techniques and its solution of the instability of high – yield clones.

Key Words: medicinal plant, high – yield clone, breeding

Cultivation of Panax Notoginseng and Progress of Its GAP Study

Chen Zhongjian, Zhang Yuqin, Huang Tianwei and Wang Bingyan

[World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 139