

金丝桃属植物的分泌结构与金丝桃素关系的研究

胡正海, 吕洪飞, 李景原

(西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要: 应用植物解剖学、组织化学和植物化学相结合的方法, 系统地研究了金丝桃属植物分泌结构与金丝桃素的关系。结果表明, 该属植物的叶和花中具有分泌细胞团和分泌囊二类内部分泌结构, 它们来源相同, 而分化发育不同。组织化学试验表明, 分泌细胞团内含金丝桃素, 而分泌囊内含油类。TLC 和 HPLC 检测该属 8 组 21 种的叶片、4 种的花及贯叶连翘的不同器官的提取物, 证明具有分泌细胞团的器官含金丝桃素, 否则缺乏, 并发现分泌细胞团的大小和密度与金丝桃素的含量成正比。9 组 45 种国产金丝桃属植物叶的比较解剖结果表明, 分泌细胞团存在于贯叶连翘组和遍地金组的 10 种内, 而分泌囊则存在于 43 种内。以上结果为金丝桃属植物资源合理开发利用和该属植物的系统分类提供了解剖学依据。

关键词: 金丝桃属; 分泌细胞团; 分泌囊; 金丝桃素

中图分类号: Q 94-336 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-274 X (2002) 05-0459-07

金丝桃属 (*Hypericum L.*) 隶属藤黄科, 全世界约 400 余种, 分为 30 组, 我国约 55 种, 8 亚种, 分为 8 组, 全国各地均有分布, 主要在西南地区^[1]。金丝桃属植物为多年生草本, 全草入药。近年来的金丝桃素具有抗抑郁、抑制中枢神经、增强免疫功能^[2, 3, 4]。从而引起医药界的重视。关于该属植物的结构, Metcalfe 和 Chalk 曾对其营养器官结构进行描述^[5]。Curtis 和 Lersten 报道, *H. perforatum* 和 *H. balearicum* 植物体具有内分泌结构^[6]。Southwell 和 Campbell 以及 Cellarova 等报道了 *H. perforatum* 的金丝桃素的含量与其腺体(即分泌结构)有关^[7, 8]。为此, 系统研究金丝桃属植物产生和贮存金丝桃素类化合物的结构——分泌结构及其与金丝桃素的关系具有理论意义, 对合理开发利用金丝桃属植物资源具有生产实践意义。

1 材料和方法

1.1 研究材料

研究材料包括金丝桃属 9 组 43 种 1 亚种 1 变种^[9]。

1.2 研究方法

1.2.1 透明材料法 取植株中部的新鲜成熟叶片及苞片和花萼, 或者用 FAA 固定的材料, 投入 5% NaOH 水溶液, 在 60 °C 温箱中透明 1~3 h, 清水冲洗, 用 1% 番红染色, 甘油胶封片。在 Leica DMLB 显微镜观察和照相, 并计数。

1.2.2 石蜡切片法 用 FAA 固定, 系列酒精脱水, 石蜡包埋, 横切或纵切, 切片厚度 8 μm, PAS-苏木精或番红-固绿染色。

1.2.3 半薄切片法 取新鲜材料用 4% 戊二醛固定液和 1% 锇酸双重固定, 系列酒精脱水, 环氧丙烷过渡, Epon812 包埋, Reiche-Jung 超薄切片机切片, 半薄切片厚 1 μm, 甲苯胺蓝或天青 B—亚甲基蓝染色, Leica DMLB 显微镜观察和照相。

1.2.4 组织化学方法和荧光显微观察

1) 氢氧化钠 (NaOH) 水溶液显色法、醋酸铅沉淀法、苏丹黑和苏丹 IV 染色法同文献^[9]

2) 荧光显微镜观察

将半薄切片和冰冻切片在紫外光或蓝光激发下观察并摄影。

收稿日期: 2002-04-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070045)

作者简介: 胡正海 (1930-), 男, 浙江湖州人, 西北大学教授, 博士生导师, 从事结构植物学研究。

1.2.5 植物化学分析方法

1) 样品制备方法

各种叶烘干后备用; 贯叶连翘则包括具分泌细胞团的叶缘部分, 仅具分泌囊的叶中央部分, 花萼、花瓣、果实, 于 60 °C 烘箱内恒温烘 12 h。再用甲醇溶解, 进行薄层层析和 HPLC 检测。标准样品金丝桃素(Hypericin)由 Sigma 公司提供。

2) 薄层层析法(TLC)

展开剂为正丁醇-冰醋酸-水=4:1:1, 摄影和扫描仪记录。

3) HPLC 检测^[9]

2 研究结果

2.1 金丝桃属植物的分泌结构

根据金丝桃属的 4 组 7 种植物的根、茎、叶、花和果实的纵、横切片观察, 该属植物明显特点是植物

体普遍具有分泌结构。

其分泌结构按其形态结构特点可分为两类: 分泌细胞团、分泌囊。前者分布于叶片、花萼、花瓣及花药药隔内; 后者分布于叶片、花萼、花瓣及果皮内。从透明叶片或花被片观察, 分泌细胞团呈圆形或条状的黑色腺点, 而分泌囊则呈圆形或条状的透明腺点(图 1-3, 4, 5, 6)。从上述器官横切面观察, 分泌细胞团是由 1~3 层呈切向扁长方形的鞘细胞包围着一团分泌细胞组成, 其中央无腔隙, 故称之为分泌细胞团(nodule), 其分泌细胞呈多角形, 体积较大, 细胞质浓厚, 而鞘细胞则明显液泡化; 分泌囊是由 1 层切向扁长方形的鞘细胞包被着 1 层长方形的上皮细胞及其中央的分泌腔构成, 故称为分泌囊(secretory cavity)。而位于表皮下的分泌囊则缺乏鞘细胞, 其中, 上皮细胞的细胞质浓厚, 而鞘细胞则明显液泡化(图 1-1, 2)。

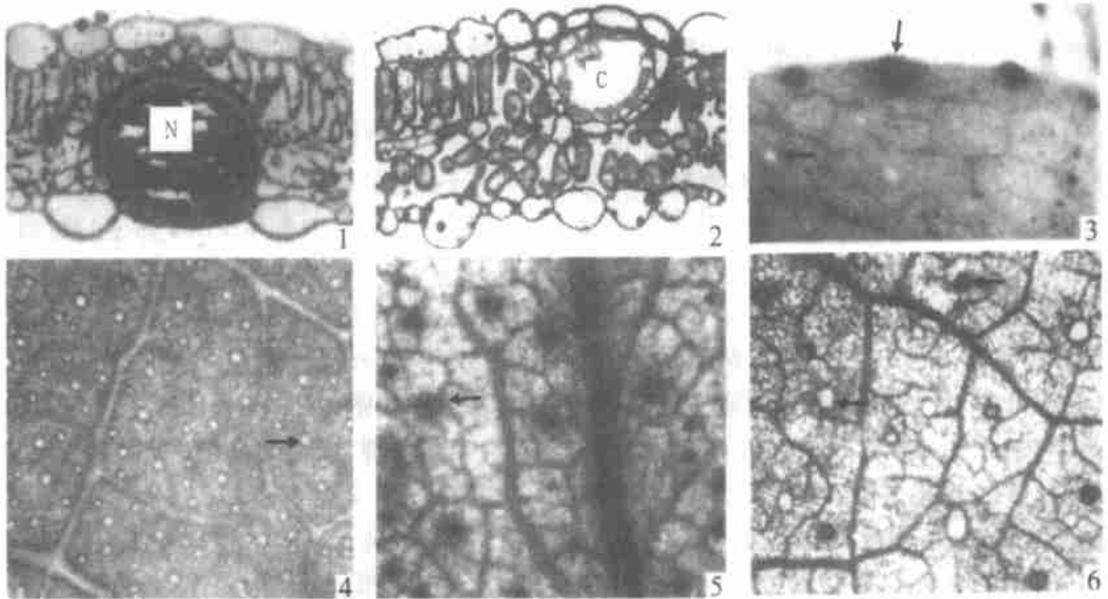


图 1 金丝桃属植物的分泌结构

Fig 1 Secretory structure of the *Hypericum*

1-2 薄切片, ×276 1 分泌细胞团 2 分泌囊 3-6 透明叶片, ×38 3 叶缘的分泌细胞团和分泌囊 4 分泌囊 5 分泌细胞团 6 分泌细胞团和分泌囊

该属的贯叶连翘和赶山鞭的叶片内都存在上述两类分泌结构, 通过对它们不同发育时期叶片的解剖观察, 发现其分泌细胞团和分泌囊都起源于叶片初生分生组织阶段的原表皮下的基本分生组织中 1 个染色较深、体积较大的原始细胞。早期细胞分裂相同, 而在以后的细胞分裂方向和分化过程不同, 从而形成结构上的差异。

2.2 金丝桃属植物分泌结构的分泌物的组织化学定位

根据贯叶连翘、密腺小连翘、元宝草和小连翘的叶片、萼片、花瓣和果实的新鲜材料冰冻切片或半薄切片经不同的组织化学试验, 其两类分泌结构的反应不同。

5%NaOH 水溶液测试结果表明, 分泌细胞团细胞内含有红色分泌物, 它遇 NaOH 溶液即转变成绿色, 而分泌囊内的分泌物为无色, 遇 NaOH 溶液无

颜色反应。

上述材料先经 5% 醋酸铅溶液处理, 然后制成石蜡切片, 可看到其分泌细胞团的细胞内出现大量红色沉淀, 而其分泌囊及未经醋酸铅溶液处理的对照材料分泌细胞团, 都无红色沉淀出现。

切片用苏丹黑染色后, 其分泌囊细胞及腔内的分泌物都染为灰黑色, 而分泌细胞团则不着色。切片用苏丹 IV 染色后, 分泌囊的分泌物为浅红色, 而分泌细胞团则不着色。

切片置荧光显微镜下, 在紫外光和蓝光的激发下, 可见到分泌细胞团的分泌物发出红色荧光, 而分泌囊的分泌物无荧光反应。

以上组织化学实验表明, 分泌细胞团和分泌囊的分泌物显色反应明显不同, 分泌细胞团的分泌物都呈金丝桃素类化合物的反应, 而分泌囊的分泌物则呈油类物质反应。

2 3 我国产的金丝桃属 45 种植物叶内分泌结构的比较解剖观察结果

根据从 7 省区采集的 9 组 43 种 1 亚种 1 变种金丝桃属植物叶片的透明装片、石蜡切片和半薄切片的观察, 该属植物的叶中, 分泌结构的类型、分布位置、分布密度和大小存在一定差异。

根据分泌结构的类型, 可以分为 3 类: 分泌细胞团的类型、只有分泌囊的类型、具分泌细胞团和分泌囊的类型。

2 3 1 只有分泌细胞团的类型 在 45 种植物中, 仅见贯叶连翘组的小连翘一种。

2 3 2 只有分泌囊的类型 在 45 种植物中, 35 种

属此类型。根据叶片横切面观察, 其分布位置又可分为栅栏组织型: 蜜花金丝组、糙枝金丝桃组和地耳草组的细叶金丝桃属于此类型; 海绵组织型: 黄海棠组植物属于此类型; 居中型: 金丝桃组、浆果金丝桃组、毛金丝桃组和遍地金组的纤茎金丝桃属于此类型; 横跨叶肉型: 地耳草组的地耳草属此类型。

2 3 3 具分泌囊和分泌细胞团的类型 在 45 种内 9 种属此类型, 包括贯叶连翘组内除小连翘外的其他 5 种, 遍地金组内除纤茎金丝桃外的 3 种。

此外, 该属不同种植物叶内分泌细胞团和分泌囊的大小和分布密度也存在一定差异(表 1)。有的分泌囊的鞘细胞不明显, 如浆果金丝桃, 有些分泌囊伸长呈分泌道状, 如金丝桃组的多数种, 而椭圆叶金丝桃则缺乏以上二类分泌结构。以上特点在植物分类中可作为解剖学依据。

2 4 金丝桃属植物分泌结构的类型与金丝桃素的相关性

上述组织化学实验结果已初步表明, 两类分泌结构的分泌物不同, 分泌囊是油类物质合成和贮存场所, 而分泌细胞团则是金丝桃素类物质合成和贮存场所。为了进一步确证以上结果, 我们应用植物化学方法比较分析测定该属 8 组 20 种 1 变种植物叶内分泌结构的类型、大小和密度与金丝桃素的关系。薄层层析(TLC)和高效液相色谱(HPLC)检测结果表明, 21 种植物中具有分泌细胞团的 5 种植物叶内含有金丝桃素, 而无分泌细胞团的 16 种植物叶内不含金丝桃素(表 1, 图 2), 从而进一步证实, 分泌细胞团是该属植物的金丝桃素合成和贮存结构。

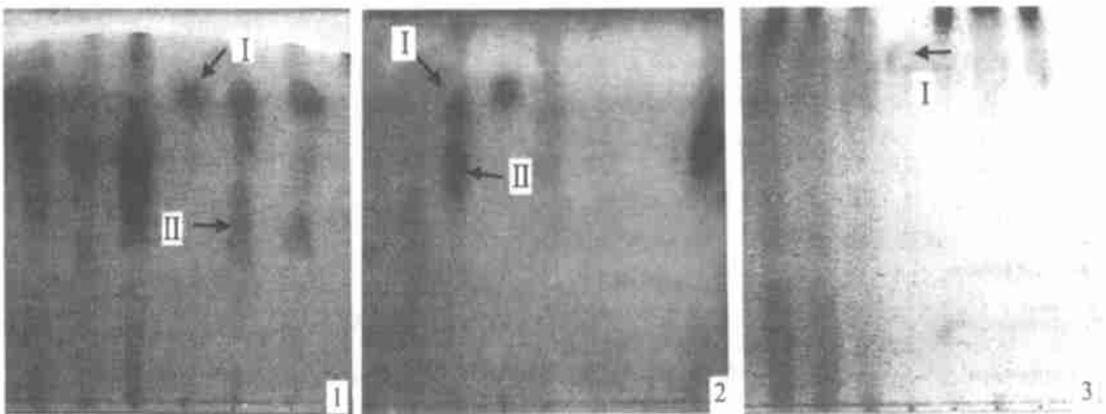


图 2 金丝桃属植物的薄层层析

Fig 2 TLC of the *Hypericum*

I 金丝桃素 II 假金丝桃素 种的序号同表 1。F 花 L 叶 K 花萼 P 花瓣 S 茎 R 根 LM 叶缘 LC 叶中央 FR 果实 HS 金丝桃素标准品

此外, 还用上述植物化学方法检测了该属 4 种植物分泌细胞团的植物花器官以及贯叶连翘的花被、

果实、根、茎和叶片的中央部分(仅具分泌囊)与边缘部(具分泌细胞团)的提取物, 结果表明, 4 种植物花

被片都含金丝桃素,在贯叶连翘中,花被、叶片边缘部分具分泌细胞团,其提取物含金丝桃素,而根、茎、果实和叶片中央部分无分泌细胞团,其提取物未检出金丝桃素(表 2,图 3)。从而进一步证明分泌细

胞团是该属植物金丝桃素合成和贮存结构。从表 2 中还反映出,金丝桃素的含量与分泌细胞团的大小和分布密度成正比。

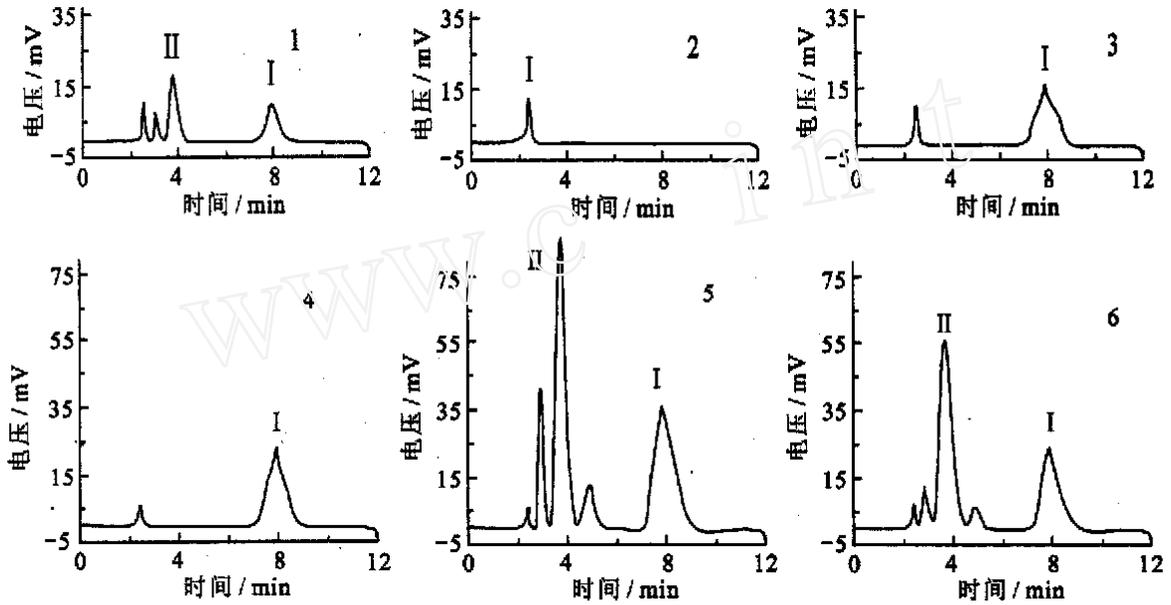


图 3 金丝桃属植物的高效液相色谱

Fig 3 HPLC of the *Hypericum*

I 金丝桃素 II 假金丝桃素 1 贯叶连翘花萼 2 贯叶连翘果实 3 毛花金丝桃 4 金丝桃素标准品 5 贯叶连翘花瓣 6 小连翘花

表 1 金丝桃属植物叶中分泌结构分布和密度与金丝桃素的含量

Tab 1 Distribution and density of secretory structures and hypericin content in the leaves of the *Hypericum*

种	分泌细胞团			分泌细胞囊		金丝桃素含量 /%	
	L	AND	Density	Diameter	L		Density
		/μm	/mm ²	/μm	/mm ²		
<i>H. ascyron</i>	A b	A b	A b	A b	SC: S	10.5	0
<i>H. japonicum</i>	A b	A b	A b	A b	SC: PS	22.0	0
<i>H. hirsutum</i>	A b	A b	A b	A b	SC: PMA	6.8	0
<i>H. monanthum</i>	LE: A	0.68	A b	70-80/75	SC: A S	9.4	0.0661
<i>H. wightianum</i>	LE: SA	0.80	A b	70-90/77	SC: S	10.4	0.0646
<i>H. sampsonii</i>	LE: A SCS	0.72	0.61	60-80/70	SC: A P S	9.4	0.0413
<i>H. erectum</i>	LE: SCS	0.32	2.10	70-80/75	A b	A b	0.1603
<i>H. perforatum</i>	LE: SCS	2.20	0.65	60-80/75	SC: A S	5.2	0.0555
<i>H. androsaemum</i>	A b	A b	A b	A b	SC: P M S	17.1	0
<i>H. densiflorum</i>	A b	A b	A b	A b	SC: P	27.4	0

注: L, 位置; AND, 叶边缘两分泌细胞团间的平均距离; A b, 缺乏; LE, 叶边缘; SC, 散生; P, 栅栏组织; S, 海绵组织; M, 介于栅栏组织和海绵组织间的类型; A, 横跨叶肉组织的类型

表 2 金丝桃属植物不同器官和部位分泌细胞团密度与金丝桃素含量

Tab 2 Nodule density of organs or parts and hypericin content in *Hypericum*

种	器 官	分泌细胞团密度	金丝桃素含量/%
贯叶连翘	Leaf margin	1.660/mm ²	0.1465
<i>H. perforatum</i>	Leaf center	A b	0
	Stem	A b	0
	Root	A b	0
	Fruit	A b	0
	Calyx	0.883/mm ²	0.0653
毛金丝桃	Calyx	2.004/mm ²	0.2579
<i>H. hirsutum</i>			
单花遍地金	Calyx	2.503/mm ²	0.3430
<i>H. monantherum</i>			
小连翘	alyx	3.125/mm ²	0.7068
<i>H. erectum</i>			

3 总结和讨论

3.1 金丝桃属植物分泌结构的类型和分布特点

Curtis 等研究该属贯叶连翘和 *H. balearicum* 后报道, 它们具有两类分泌结构-分泌细胞团和分泌囊^[6]。我们研究了该属的赶山鞭、蜜腺小连翘、元宝草和小连翘不同器官结构, 也发现两类分泌结构。在此基础上, 系统研究了该属 9 组 43 种 1 亚种 1 变种植物叶的结构, 发现分泌细胞团仅存在于贯叶连翘组 7 种和遍地金组 3 种。此外, 毛金丝桃的叶内无分泌细胞团, 而其花被中有分泌细胞团。但在 45 种植物中除小连翘和椭圆叶金丝桃外, 都具有分泌囊。根据分泌细胞团在叶片上的分布位置可以分为两种类型: 叶缘型(6 种)和分散型(4 种)。分泌囊在叶片上都呈分散分布, 但根据它在叶片横切面中位置可分为栅栏组织型(3 种)、海绵组织型(2 种)、居中型(29 种)、横跨型(1 种), 其中浆果金丝桃叶中分泌囊无鞘细胞, 仅由 1 层上皮细胞包被分泌腔构成。以上分泌结构的类型、分布及大小等特征, 可以作为该属植物分组的依据。

3.2 金丝桃属植物的分泌结构与金丝桃素类化合物的关系

Southwell 和 Campbell 对贯叶连翘不同器官中金丝桃素的含量与其腺体密度进行了对比分析, 结果表明, 金丝桃素的产生与腺体有关^[7]。Cellarova 等研究了贯叶连翘体细胞培养的再生植株的腺体密度与金丝桃素含量变化的关系, 证实金丝桃素是由黑色腺点合成和积累的^[8]。通常所谓腺点即是分泌囊和分泌细胞团的统称, 上述报道未具体阐明何类

分泌结构, 并缺乏直接的组织化学定位证明。金丝桃素是萘并二蒽酮化合物, 化学式为 C₃₀H₁₆O₈, 相对分子量为 504.43, 遇 NaOH 溶液呈绿色, 与金属离子 (Pb²⁺) 反应形成络合物, 并具有红色荧光^[10, 11]。根据其上述特性, 我们设计了 5% NaOH 水溶液, 0.5% 醋酸镁甲醇液和 5% 醋酸铅溶液等 3 种组织化学方法分别处理贯叶连翘叶的切片, 发现分泌细胞团的内容物的反应都属阳性, 而其分泌囊则属阴性。在荧光显微镜下观察, 分泌细胞团产生红色荧光, 而分泌囊不显荧光。以上组织化学定位观察结果表明, 分泌细胞团内贮存金丝桃素类物质。应用苏丹黑和苏丹 IV 溶液分别处理上述切片, 则分泌囊的内容物呈油类物质的阳性反应, 而分泌细胞团则为阴性。从而说明同一叶片中 2 种形态结构不同的分泌结构, 其生理功能不同, 合成的次生产物不同。为了进一步确证组织化学实验的结果, 我们应用 TLC 和 HPLC 二种植物化学方法检测了该属 8 组 21 种的叶片和 4 种的花及贯叶连翘各器官的提取物, 结果表明: 在种类间, 16 种的叶片中无分泌细胞团的都不含金丝桃素, 5 种的叶片及 4 种的花中具有分泌细胞团, 都含金丝桃素; 在贯叶连翘同一植物体上, 根、茎、果实和叶片中央部分无分泌细胞团, 其提取物不含金丝桃素, 而花萼、花瓣和叶片边缘部分具有分泌细胞团, 则含金丝桃素。研究结果还表明, 金丝桃素的含量高低与其分泌细胞团的大小和分布密度呈正相关。

以上的研究作为今后该属植物资源的开发利用, 提供了鉴别有无金丝桃素的植物解剖指标, 同时也为今后选育高含量的金丝桃属种类提供了科学依据。

3.3 金丝桃属植物分泌结构的类型分布与该属系统分类的关系

上述该属分泌结构的类型和分布,可以为种间鉴别的重要依据。Robson 曾指出匙叶金丝桃与其近缘种金丝梅和西南金丝梅从植物形态上很难区分^[12]。但从叶的解剖结果表明,匙叶金丝桃的分泌囊的直径明显大于其他 2 种植物,可以作为分种依

据之一(表 2)。此外,在所研究的 45 种金丝桃属植物中,惟有椭圆叶金丝桃缺乏分泌囊或分泌细胞团,而且还发现其叶片结构中,上表皮下具异细胞,细叶脉与表皮间有机组织,韧皮部内有纤维群,上述结构特征在该属其他 44 种植物叶片内未发现。为此,我们认为文献[12]将该种植物另立为新属的看法是正确的^[12]。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会 中国植物志(50 卷第二分册) [M] 北京: 科学出版社, 1990

[2] 潘映红, 郭宝林 国产金丝桃属植物有效成分研究概况[J] 中药材, 1993, 16(8): 40-42

[3] L NDE K, RAM REZ H, MULROW C D, et al St John s word for depression: An overview and meta-analysis of randomized clinical trials[J] British Medical Journal, 1996, 313(7 052): 253-258

[4] EV ST IFEEVA T A, S B R YA K S V. Imm unotropic properties of biologically active products obtained from John word (H. perforatum) [J] Eksperimetal nayai Klinicheskaya fom aka logika, 1996, 59(1): 51-54

[5] METCAL FE C R, CHAL K L. A natomy of D icotyledons [M] Vo1 II. Oxford of the Clarendon press, 1957.

[6] CURT IS J O, LEARSTEM N R. Internal secretory structures in *Hypericum* (Clusiaceae): *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum balearicum* L [J] New Phytol, 1990, 114: 571-580

[7] SOUTHWELL I A, CAMPBELL M H. Hypericin content variation in *Hypericum perforatum* in Australia [J] Phytochemistry, 1991, 30(2): 475-478

[8] CELLAROVA E, DAXENROVA Z, KMAKOVA K, et al The variability of the hypericin content in the regenerates of *Hypericum perforatum* [J] Acta Bio tech, 1994, 14: 267-274

[9] 吕洪飞, 胡正海 金丝桃属植物叶中分泌结构的比较解剖学研究[J] 植物分类学报, 2001, 39(5): 393-404

[10] 肖崇厚 中草药化学[M] 上海: 上海科学技术出版社, 1987. 145-149

[11] 姚新生 天然药物化学[M] 北京: 人民卫生出版社, 1997. 174-177.

[12] ROBSON N. *Hypericum uralum* [J] New plantsman, 1995, 2(4): 242-245

(编辑 徐象平)

A study on the secretory structures and their relation to hypericin in *Hypericum* L.

HU Zheng-hai LU Hong-fei LI Jing-yuan

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069)

Abstract The secretory structures and their relation to hypericin in *Hypericum* L were studied by the comparative anatomy, histochemistry and phytochemistry. There were two types of secretory structures at leaf and flower: nodules and cavity. They shared same origin and different development. The results of histochemistry observation showed that hypericin existed in nodules and oil existed in cavity. The results of TLC and HPLC showed that the organs with nodules containing hypericin and the organs without nodules did not contain hypericin. The size and the density of nodules had a positive correlation to the content of hypericin. The comparative anatomical study were carried out on the leaves of 45 species of 9 sections. The species of *Hypericum* and 10 species of *Adenosepalum* had nodule, 43 species had cavity. The results have provided reference for the exploiting and systematical classification of *Hypericum*.

Key words: *Hypericum*; Secretory Nodule; Secretory Nodule Cavity; *Hypericin*