

粉叶小檗愈伤组织的培养及小檗碱的含量*

李启任 杨峻芸 曹安飞 赵梅

(云南大学生物系, 昆明 650091)

摘要 由粉叶小檗 (*Berberis pruinosa*) 的茎、腋芽、叶、实生苗的子叶及胚轴均可诱导出愈伤组织。B₅+2, 4-D 0.5 mg/L+KT 0.2 mg/L 培养基对诱导较好, 而 B₅+2, 4-D 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L 对愈伤组织生长较适宜。接种量在 0.4—0.8g (20 mL 培养基) 之间较为适宜。经薄层层析—分光光度法、薄层扫描法鉴定, 证明愈伤组织具有合成小檗碱的能力, 含量高达 1.8148%, 接近原植物体含量 (茎, 1.58%)。

关键词 粉叶小檗, 小檗碱, 愈伤组织

CALLUS CULTURE OF BERBERIS PRUINOSA AND BERBERINE CONTENT IN CALLUS

LI Qi-Ren, YANG Jun-Yun, CAO An-Fei, ZHAO Mei

(Department of Biology, Yunnan University, Kunming 650091)

Abstract Form the excised stem, axillary bud, leaf, cotyledon, plumulax axis of *Berberis pruinosa* Franch. the callus could be induced on Gamborg(B₅) medium or Murashige-Skoog(MS) medium, but B₅ was better than MS. The combination of 2,4-D 0.5 mg/L and KT 0.2 mg/L was found most effective for induction, while the combination of 2,4-D 0.5 mg/L and KT 0.5 mg/L was better to growth and alkaloids synthesis. The optimum inoculum quantities for callus growth was about 0.4—0.8g / 20 mL media.

Identification by thin-layer chromatography, ultraviolet and visible absorption spectrum of alcohol extracts of callus and stem, leaves of *B. pruinosa* Franch. proved that the callus had the capability to synthesize berberine. The contents of berberine in the callus was 1.8148%, it is slightly higher than the contents of berberine in the stems of intact plants (it was 1.58%).

The growth curves of the callus are sigmoid. When the callus had cultured for about 27 days, the growth rate and contents of berberine were higher than other times.

Key words *Berberis pruinosa*, Berberine, Callus

粉叶小檗 (*Berberis pruinosa* Franch.) 又称大黄连刺、三颗针等, 多年生灌木, 分布于广西北部, 云南中部至西北部, 西藏南部及东南部^[1]。它的化学成分中有小檗碱、掌叶防己碱及药根碱, 是西南几省提取黄连素的主要原料之一。经昆明市第一人民医院临床试验, 该药对菌痢、肠炎、结膜炎、中耳炎、感冒、滴虫性阴道炎等病确有疗效, 对浸润性肺结核、渗出性胸膜炎、流行性腮腺炎等方面亦有一

定疗效^[2]。但由于对植株需要量大,植物生长又缓慢,经历年大量采挖,野生资源已渐枯竭。我们试应用细胞培养技术,从粉叶小檗培养物中提取小檗碱,对细胞生长和产物积累等种种因素进行研究。国内曾有小檗属植物的有关报道^[3],但目前未见粉叶小檗组织培养研究的报道。

材料和方法

1. 愈伤组织的诱导

用粉叶小檗野生植株的茎、腋芽、叶片及种子萌发苗的子叶和胚轴作外植体材料,用自来水冲洗 15 min 后,在无酶洗衣粉液中振荡 10 min,再用自来水冲洗 15 min,无菌条件下于 75%酒精中浸泡 10 s 后,用 0.1%升汞作表面灭菌 8 min,无菌水冲洗 4—5 次后,将茎和胚轴切成 0.5 cm 长的小段,叶片切成 0.5 cm² 的小块,腋芽剥除外层老叶,子叶切下,接种于 MS^[4] 和 B₅^[5] 培养基上,激素为 2, 4-D 0.5+KT0.2, 或 2, 4-D1.0+KT0.2 (激素浓度单位为 mg/L, 以下同)。在温度 20±1℃ 的恒温箱中暗培养。子叶及胚轴在培养 1 周左右出现浅黄色愈伤组织,腋芽及茎的愈伤组织在 2 周左右产生,叶片愈伤组织在 2 周后陆续形成。

2. 愈伤组织的培养

来自子叶的愈伤组织在 B₅+2,4-D 0.5+KT0.5 培养基上继代培养选择 (3—4 周继代一次),经 7 代培养后选择出生长快、颜色黄、质地疏松的愈伤组织无性系,转移到 13 种不同的培养基上避光培养,培养用 50 mL 三角烧瓶,内盛 20 mL 培养基,每接种愈伤组织 2—3 块 (约 0.5—1.5 gFW),生长速度以每天每升培养基上平均增加的鲜重或干重的克数表示 (g·d⁻¹·L⁻¹)。

3. 小檗碱的鉴定和含量测定

小檗碱的提取:愈伤组织干粉 (65℃ 下烘干) 100 mg,用 50 mL 甲醇在索氏提取器中提取至甲醇无色,提取液浓缩后,用甲醇定容为 5 mL 或 10 mL,作点样用^[6, 7]。

小檗碱的鉴定及含量测定:小檗碱含量测定用薄层层析-分光光度法^[8],点样量 50—100 μm,相当于样品 0.5—1 mg。色斑刮取后用 0.05 mol/L 硫酸乙醇浸提 30min,4000 r/min 离心 15 min,提取上清液在 UV-120 型分光光度计 (日本岛津) 上 420nm 处,以同等面积的硅胶硫酸乙醇提取液 (离心上清液) 作对照测量吸光度,并在 200—500nm 波长范围内测定吸收光谱,另用 CS-910 型双波长薄层扫描仪 (日本岛津) 在 200—500nm 波长对样品的与标准品 (硫酸小檗碱) 的层析斑点进行扫描 (狭缝 1mm×1mm,扫描宽度 1×5mm,锯齿扫描,反射吸收)。

以上实验均重复 3—6 次。小檗碱含量以干重的百分比 (%) 表示。

结果和讨论

1. 不同培养基对愈伤组织诱导和生长的影响

愈伤组织的诱导结果如表 1, B₅ 培养基较 MS 培养基好,两种培养基中,KT 一定浓度时,2, 4-D 浓度稍低更有利愈伤组织诱导,单加 2, 4-D 也能诱导出愈伤组织,但没有 2, 4-D 和 KT 复合使用效果好。

对愈伤组织的生长, B₅ 培养基仍优于 MS, 其生长速度较 MS 高一倍左右,当 KT 浓度一定时,2, 4-D 过高会抑制生长。根据这一结果,以后继代培养主要采用 B₅ 培养基。

接种量多少对愈伤组织生长亦会影响,结果如表 2, 接种量偏低或偏高都不利于愈伤组织的生长。最适宜的接种量是 0.4—0.8 gFW (20 mL 培养基), 此范围内接种,鲜重和干重增长较高。

表1 不同培养基对愈伤组织诱导和生长的影响

Table 1 Effect of different medium on growth and induction of callus

Basic medium	2,4-D (mg/L)	KT	Percent of callus formation (%)	Increment of FW (g.d. ⁻¹ .L ⁻¹)	Increment of DW (g.d. ⁻¹ .L ⁻¹)
MS	1.0	0.2	17.72		
	0.5	0.2	25.11		
	0.5	0	15.00		
	1.0	0.5		2.7874 ± 0.9817	0.1635 ± 0.0595
	0.5	0.5		3.2627 ± 1.0485	0.1762 ± 0.0434
B ₅	1.0	0	15.00		
	1.0	0.2	55.77		
	0.5	0.2	58.95		
	1.0	0.5		4.1999 ± 1.0485	0.2400 ± 0.0654
	0.5	0.5		4.3868 ± 0.8085	0.2655 ± 0.0661

• Percent of callus formation calculated at 19 days after inoculating explant (cotyledon). Callus grew for 23 days.

表2 接种量对愈伤组织生长的影响

Table 2 Effect of inoculum quantity on callus growth

Inoculative quantity (g FW / 20 mL media)	Increment of FW (g.d. ⁻¹ .L ⁻¹)	Increment of DW (g.d. ⁻¹ .L ⁻¹)
0.3602	3.7385	0.2044
0.4567	4.0059	0.2191
0.5707	4.6511	0.2544
0.6518	4.3412	0.2374
0.7476	5.2399	0.2866
0.8477	5.1769	0.2832
1.3207	0.3985	0.0217

• Medium: B₅+2,4-D 0.5 mg / L+KT 0.5 mg / L. Callus grew for 23 days.

2. 粉叶小檗愈伤组织中小檗碱的含量

为了解愈伤组织是否含有合成原植物所含的有效成分小檗碱的能力, 进行了分析鉴定。薄层层析的结果表明, 愈伤组织中含有和原植物相同的有效成分小檗碱, 其 Rf 值和标准品 (硫酸小檗碱) 的 Rf 一致, 为 0.43。样品和标准品的层析斑点扫描结果 (图 1) 表明, 扫描峰在同一位置, 且两者的分别峰面积之和与二者叠点样得到的峰面积近相等。据文献[2]记载, 粉叶小檗地上部分含有掌叶防己碱, 但我们做的另一试验 (展层剂为苯-氯仿-异丙醇 = 8 : 8 : 2, v / v), 愈伤组织中无掌叶防己碱, Rf 0.32 的斑点和文献报道的药根碱位置相近^[2]。愈伤组织 (甲醇提取液) 层析层, 小檗碱斑点洗脱液的紫外光和可见光吸收光谱, 除 228nm 处吸收峰有所前移外, 其余与标准品吸收光谱是一致的 (图 2); 小檗碱斑点薄层扫描结果, 显示两者的吸收光谱基本相同, 证明从愈伤组织中分离出的是小檗碱。

表3 愈伤组织、植物茎、叶小檗碱含量比较

Table 3 The comparison of berberine contents between callus and stems, leaves of intact plant

Material	Callus 3	Callus 4	Stem **	Stem *	leave *
berberine cont. (%DW)	1.5210	1.8148	0.8941	1.5800	0.2130

3,4: Grown medium of callus is B₅+2,4-D 0.5mg / L+KT 0.5mg / L, B₅+0.5mg / L+KT 0.5mg / L respectively.

• Result of this test. ** The information in literature. Callus grew for 20—23 days.

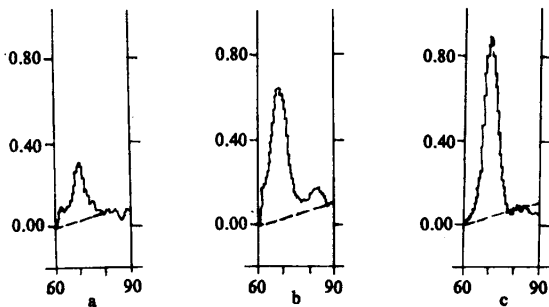


图1 小檗碱斑点薄层扫描(波长420 nm) a.标准硫酸小檗碱 2 μg; b.愈伤组织甲醇提取液 10 μm; c.标准硫酸小檗碱 2 μg+愈伤组织甲醇提取液 10 μL

Fig.1 Thin layer chromatographic scanning of berberine spot (wavelength 420 nm). a. Standard berberine sulfate 2 μg; b. Methyl alcohol extract of callus 10 μL; c. Standard berberine sulfate 2 μg+Methyl alcohol extract of callus 10 μL.

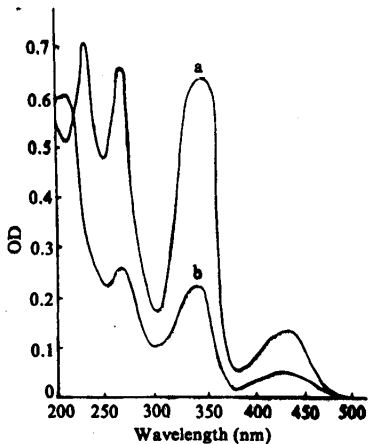


图2 小檗碱的吸收光谱(分光光度法) a.标准硫酸小檗碱 (10 μg / mL); b.样品

Fig. 2 The absorption spectrum of berberine (spectrophotometry) a. Standard berberine (10 μg / mL); b. Sample (callus)

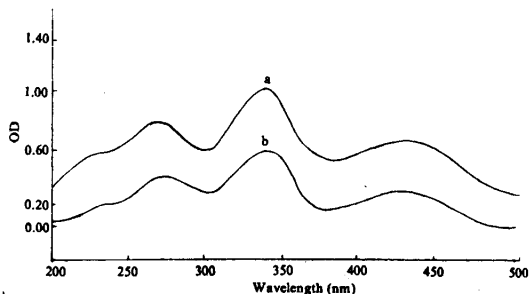


图3 小檗碱吸收光谱(薄层扫描) a.标准硫酸小檗碱; b.样品

Fig. 3 The absorption spectrum of berberine (thin layer chromatographic scanning) a. Standard berberine sulfate; b. Samble (callus)

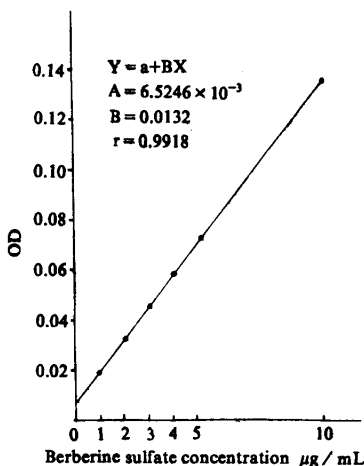


图4 硫酸小檗碱标准曲线(测定波长: 420 nm)

Fig. 4 The standard curve of berberine sulfate (determination wavelength: 420 nm)

小檗碱含量的测定是以硫酸小檗碱为标准样品, 制得标准曲线(图4), 以此为标准测得愈伤组织、植物体茎和叶的小檗碱含量(表3)。文献记载粉叶小檗茎含小檗碱 1.58%, 但在我们的试验中, 茎含 0.8941%。就与文献资料比较, 所获得愈伤组织小檗碱含量也接近原植物的含量。

表 4 不同培养基对愈伤组织生长和小檗碱含量的影响

Table 4 The influence of different medium of callus growth and berberine content in callus

Medium	Culture generation	Culture time (d)	Increment of FW (g.d. ⁻¹ L ⁻¹)	Increment of DW (g.d. ⁻¹ L ⁻¹)	Berberine content (% DW)
MS	8	27	3.2627 ± 0.8250	0.1762 ± 0.0434	1.2111
	9	27	2.7040 ± 0.3886	0.1702 ± 0.0245	1.1663
B ₅	8	23	4.1999 ± 1.0485	0.2655 ± 0.0695	1.5182
	9	23	3.8625 ± 1.4086	0.1905 ± 0.0695	1.8148
	10	23	4.4833 ± 1.6470	0.2283 ± 0.0838	1.5477

Hormone concentration: 2,4-D 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L

表 5 植物激素对愈伤组织生长和小檗碱含量的影响

Table 5 The influence of growth regulator on callus growth and berberine content

Auxins (mg.L ⁻¹)	Cytokinins (mg.L ⁻¹)	Increment of FW (g. d. ⁻¹ L ⁻¹)	Increment of DW (g. d. ⁻¹ L ⁻¹)	berberine content (% DW)
2,4-D 1.0	BA 0.5	1.1785 ± 0.0299	0.0919 ± 0.0803	0.7465
2,4-D 0.5	BA 0.5	2.8057 ± 1.3002	0.1711 ± 0.0793	0.6663
2,4-D 1.0	KT 0.5	3.8885 ± 1.3401	0.1879 ± 0.0645	1.2272
2,4-D 0.5	KT 0.5	4.4833 ± 1.6470	0.2283 ± 0.0838	1.5477
NAA 1.0	KT 0.5	1.0266 ± 0.4735	0.0815 ± 0.0376	1.4676
NAA 1.5	KT 0.5	1.2437 ± 0.8919	0.0909 ± 0.0652	1.3467
IAA 1.0	KT 0.5	1.6056 ± 0.6590	0.1469 ± 0.0599	1.0403
IAA 1.5	KT 0.5	1.5162 ± 0.5800	0.1154 ± 0.0442	1.2540
2,4-D 1.0		2.9433 ± 0.9881	0.1648 ± 0.0553	0.8533
		2.1136 ± 0.0023	0.1332 ± 0.0571	1.1739

• B₅ medium. Callus grew for 23 days.

3. 培养基及植物激素对愈伤组织生长和小檗碱含量的影响

试验选择了 MS 和 B₅ 培养基做比较, 结果为表 4, B₅ 培养基在生长量和生物碱合成方面都优于 MS, 该表也说明所选出的愈伤组织无性系的生长速度及小檗碱含量基本稳定。

从图 4 可看出愈伤组织生长及小檗碱含量的关系, 无论是鲜重还是干重, 小檗碱含量在培养 27d 左右达到最高, 有关小檗属植物细胞培养的研究结果为产物积累落后于细胞生长^[3], 而本试验中两者是同步的, 细胞生长与小檗碱积累曲线几乎是平行的, 呈“S”型。

植物生长调节剂对愈伤组织生长和小檗碱含量的影响, 结果如表 5: 单加入 2, 4-D 或 KT, 愈伤组织都能生长, 其中加 2, 4-D 的比加 KT 的生长快, 但小檗碱含量上, 加 KT 的高于加 2, 4-D 的, 而单独使用均比不上复合使用的效果。细胞分裂素和生长素类复合使用时, 细胞分裂素为 2, 4-D, NAA, IAA, 则它们对生长作用效果是 2, 4-D > IAA > NAA, 但对小檗碱合成的影响效果却是 NAA > 2, 4-D > IAA; 生长素类为 2, 4-D, 细胞分裂素为 KT 和 BA 时, 在细胞生长和生物碱合成两方面均是 KT 优于 BA; KT 一定浓度时, 2, 4-D 浓度稍低更有利于细胞生长及小檗碱的合成。本试验中 2, 4-D 0.5mg/L+KT 0.5mg/L 的复合使用是最佳的。

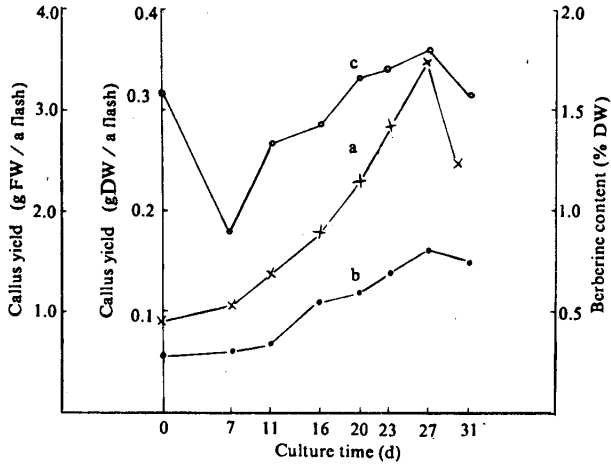


图 5 愈伤组织生长过程中生长速度和小檗碱含量的关系 a. 愈伤组织产量 (gFW / 瓶); b. 愈伤组织产量 (gFW / 瓶); c. 小檗碱含量 (%DW)。起始接种量 0.9540 ± 0.0961 g (FW) / 瓶

Fig. 5 The relation between berberine content growth rate during callus growth a. Callus yield (gFW / a flash); Callus yield (g DW / a flash); c. Berberine content (% DW). Initial inoculum quantity 0.9540 ± 0.0961 g(FW) / a flash

试验所获得的愈伤组织生长速度高达 $4.4833 \text{ g (FW) } \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, 干重增加达 $0.2283 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, 产率为 $174.5 \text{ g (FW) } \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基, $7.105 \text{ g (干细胞) } \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基, 小檗碱含量达到 1.8148%, 接近原植物体含量, 但用于工业化生产还有不足, 需进一步提高生长速度及有效成分含量和大批量细胞培养技术。

参 考 文 献

- [1] 肖培根, 宋万志, 刘国声等. 中国产小檗属药用植物的研究——分类、分布和药用价值. 植物分类学报, 1974, 12 (4): 385—405.
- [2] 吴征镒主编. 新华本草纲要 (第一卷). 上海: 上海科技出版社, 1988. 141—153.
- [3] 侯嵩生, 李新民, 吴王兰等. 九连小檗悬浮培养细胞生理生化特性的研究. 武汉植物学研究, 1990, 1: 65—68.
- [4] Murshige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15:473—480.
- [5] Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp cell Res*, 1968, 50:148—155.
- [6] 徐礼荣, 沙世炎. 中草药有效成分分析 (下册). 北京: 人民卫生出版社, 1984. 37—52.
- [7] 彭华, 周自新. 黄连及制剂中小檗碱的含量测定. 中成药研究, 1984, 12: 13—16.
- [8] 中国医学科学院药物研究所编. 薄层层析及其在中草药分析中的应用. 北京: 科学出版社, 1978. 125—137.