

2.5 各组培养神经元培养液中 SOD、MDA 含量 见表 3。

表 3 各组培养神经元培养液 SOD、MDA 含量

组别	n	SOD/(u · ml ⁻¹)	c(MDA)/(μmol · L ⁻¹)
I 组	50	151.23 ± 3.28	6.63 ± 0.34
II 组	50	148.33 ± 1.58	6.52 ± 1.17
III 组	50	171.21 ± 2.87*	5.12 ± 0.71*
IV 组	50	178.37 ± 3.18*	5.34 ± 1.21*
F		21.82	17.19
P		<0.05	<0.05

* 与 I 组比较, P < 0.05

3 讨论

激光生物学是激光技术向生物学渗透而形成的新兴边缘学科,是当今医学科学和老年学非常活跃的交叉学科。特别是低强度氦氖激光照射在中枢神经系统疾病的治疗和抗衰老保健方面具有广阔的应用前景,但其作用机制至今尚无统一的认识。研究发现自由基是造成衰老的重要因素^[5-7],一般认为低强度氦氖激光照射对衰老或病理情况下的机体内抗氧化酶具有调节作用。

本实验结果显示,氦氖激光照射能明显增加神经元胞体面积、直径及存活数目,具有促进神经元生长发育、延缓衰老的作用,同时可明显提高培养神经元抗氧化酶 SOD 活性,降低自由基反应终产物 MDA 含量,表现出抗氧化酶活性,减轻脂质过氧化

损伤。氦氖激光照射可使因光化作用失活或减退的神经元抗氧化酶活性恢复或提高,从而加速自由基的清除,阻断其对神经元的损伤,延缓神经元衰老。

因此,作者认为,氦氖激光照射可能通过调节自由基代谢,提高线粒体的呼吸功能,增加神经元尼氏体含量,进而增加神经元蛋白质及内源性营养因子的合成,为神经元提供能量和生物信息,从而达到促进神经元生长发育、抗衰老、抗损伤的作用。

参考文献

- 1 刘伟,李宛青,吴爱群,等. 氦氖激光穴位照射对缺血缺氧新生大鼠海马组织超微结构的影响. 郑州大学学报(医学版),2004,39(3):423
- 2 何静,陈方祥,王琳. 低能量 He-Ne 激光内照射对神经系统疾病的治疗. 第三军医大学学报,2001,23(4):496
- 3 Dichter MA. Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. Brain Res, 1978,149(2):279
- 4 胡刚,刘清华,周旻,等. 体外培养人胚神经细胞衰老性变化的初步观察. 中华老年医学杂志,1991,10(4):229
- 5 Hochman JS, Choo H. Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage. Circulation, 1987,75(1):299
- 6 Leibovitz BE, Siegel BV. Aspects of free radical reactions in biological systems: ageing. J Gerontol, 1980,35(1):45
- 7 凌治萍. 细胞生物学. 北京:人民卫生出版社,2001. 229

(2005-06-07 收稿 责任编辑王 曼)

中国粗榧愈伤组织的诱导*

黄进勇^{1)Δ} 李永欣¹⁾ 岳彩鹏¹⁾ 郭 锋²⁾

1) 郑州大学生物工程系 郑州 450001 2) 郑州大学第四附属医院药剂科 郑州 450044

Δ男,36岁,博士,副教授. 研究方向:生物多样性与生物技术, Email: jinyhuang@zzu.edu.cn

关键词 中国粗榧;愈伤组织;组织培养

中图分类号 Q945.5

摘要 目的:应用现代生物技术研究中国粗榧的组织培养技术。方法:观察不同消毒时间(5 min, 10 min, 15 min),不同激素(6-苄基嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)、6-吡喃氨基嘌呤(KT)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D))组合及不同激素浓度的 MS 培养基对中国粗榧不同的外植体材料(茎尖、当年生幼茎、当年生幼叶)愈伤组织诱导的影响。结果与结论:选用茎尖、幼茎为外植体,消毒时间为 10 min,培养基以 MS + 6-BA + NAA + 2,4-D (6-BA、NAA 质量浓

度均为 20 mg/L, 2,4-D 为 1.0 mg/L) 可较好地诱导中国粗榧愈伤组织的形成。

Callus induction of Chinese cephalotaxus sinensis

HUANG Jinyong¹⁾, LI Yongxin¹⁾, YUE Caipeng¹⁾, Guo Feng²⁾

1) Bioengineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001 2) Department of Pharmaceutics, the Fourth Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450044

Key words Chinese cephalotaxus sinensis; callus; tissue culture

Abstract **Aim:** To study the method of tissue culturing of Chinese cephalotaxus sinensis by modern biological technology. **Methods:** By observing the different sterilization time, the different hormone combination and the different explants, the optimum conditions of callus induction on Chinese cephalotaxus sinensis were studied. **Results and Conclusion:** It is shown that the stem apex and the young stem are suitable explants. With 10 min sterilization time and the culture medium MS + 6-BA + NAA + 2, 4-D, more ideal callus can be induced.

中国粗榧 (Chinese cephalotaxus sinensis) 是我国特有濒危型树种, 其果实、枝叶及树皮中含有三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱等 20 多种生物碱有效成分, 具有抗癌活性, 对治疗白血病和恶性淋巴瘤、绒毛膜上皮癌、胃癌、肺癌等均有一定疗效, 并已用于临床。由于中国粗榧生长缓慢, 且其生物碱的含量又极低, 无法满足生产需要, 急需应用现代生物技术研究 and 探索中国粗榧的培养技术和方法^[1,2]。目前普及率最高, 国内外最成功的是组织培养的微繁技术, 其占地小, 耗材少, 繁殖周期短、速度快、系数高, 产量大, 已被广泛应用于多种植物及花卉的保存和繁殖^[3-5]。作者采用组织培养方法对中国粗榧的愈伤组织进行诱导, 探索其微繁途径, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 中国粗榧样品采自河南省南阳市宝天曼保护区葛条爬国有林场, 采集时间为 2005 年 4 月中旬。

1.2 方 法

1.2.1 培养基母液及培养基的配制: 以 Murashige 和 Skoog 培养基 (简称 MS 培养基) 为基本培养基, 并附加不同浓度的 6-苄基嘌呤 (6-BA)、萘乙酸 (NAA)、6-咪喃氨基嘌呤 (KT)、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 等。MS 培养基母液包括 4 种, 即 1 号母液 (为大量元素成分)、2 号母液 (铁盐)、3 号母液 (为微量元素成分) 和 4 号母液 (维生素成分)。

配制 MS 培养基时, 分别向烧杯中顺序加入 1 号母液 100 ml、2 号母液 5 ml、3 号母液 5 ml 和 4 号母液 5 ml, 并加入适量蒸馏水, 按 30 g/L 加入蔗糖调节渗透压, 按 8 g/L 加入琼脂, 加热, 搅拌。待琼

脂完全熔化后定容至 1 000 ml, 调整 pH 至 5.8 ~ 6.0。均匀分装在三角瓶中 (50 ml/瓶), 标记后灭菌 15 min (温度 121 °C, 压力 110 kPa), 然后置于人工气候箱中保存备用。

1.2.2 愈伤组织诱导: 第 1 次接种: 选取茎尖、当年生幼叶、当年生幼茎作为实验用外植体。用清水冲洗干净后置于 0.2 g/L 新洁尔灭溶液中浸泡 10 min, 取出, 用无菌水冲洗 3 次; 再置于 1.0 g/L 升汞溶液中浸泡 10 min, 取出, 用无菌水冲洗 3 次。外植体材料先用紫外灯灭菌 20 min 后, 于超净工作台上取茎尖 2 mm, 幼叶、幼茎各 5 mm, 分别接种于附加不同激素组合及浓度配比 (见表 1) 的 MS 培养基上, 每种外植体接种 6 瓶, 每瓶接种 5 块 (计 30 块); 第 2 次接种: 不同的外植体材料在 0.2 g/L 新洁尔灭溶液及 1.0 g/L 升汞溶液中分别消毒 5 min、10 min 或 15 min。在筛选的 MS + 6-BA + NAA + 2,4-D 培养基 (6-BA、NAA 浓度均为 2.0 mg/L, 2,4-D 浓度为 1.0 mg/L) 上, 每类外植体接种 3 瓶, 每瓶接种各类外植体各 3 块 (计 9 块)。2 次接种均置于温度为 28 °C, 相对湿度 70% 的人工培养箱中培养, 光照时间 8 h/d。每 3 d 定时观察。

1.2.3 观察指标: 计算污染率与出愈率。污染率 = (污染外植体数/接种外植体数) × 100%; 出愈率 = (发生愈伤组织的外植体数/接种外植体数) × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合及浓度对比对 3 种外植体愈伤组织的诱导作用 见表 1。由表 1 可知, 将不同外植体接种在附加 6-BA、NAA、2,4-D 与 KT 的不同组

合及浓度配比的诱导培养基上,对愈伤组织诱导率的影响存在明显的差异,而无激素的对照组(编号1)及仅加入2,4-D的处理组(编号2,3)无愈伤组织产生(但在高激素浓度时,添加适当浓度的2,4-D处理却表现出极高的诱导率),这说明激素在愈伤组织产生过程中起决定作用。

3种外植体材料中,出愈率最高的激素组合与浓度配比见编号17,茎尖、幼叶、幼茎出愈率分别为93.3%、33.3%、96.7%,幼叶出愈率相对较低。幼叶形成致密、浅黄色的愈伤组织,生长缓慢,为保守分裂型愈伤组织,容易分化成苗。幼茎和茎尖形成疏松、微褐色的愈伤组织,生长旺盛,繁殖速度快,为亢进分裂型,易通过悬浮培养获得单细胞。

表1 激素及浓度组合对不同外植体愈伤组织诱导的影响

编号	激素浓度 / mg · L ⁻¹				出愈率 / %		
	6-BA	NAA	2,4-D	KT	茎尖	幼叶	幼茎
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1.0	0	0	0	0
3	0	0	2.0	0	0	0	0
4	0.5	0	1.0	0	0	0	0
5	2.0	0	1.0	0	0	0	0
6	1.0	0	2.0	0	0	0	0
7	0	0.5	2.0	0	0	0	0
8	1.0	0	0	0	0	0	0
9	1.0	0.2	0	0	10.0	0	3.3
10	1.0	0.5	0	0	60.0	10.0	36.7
11	2.0	0.2	0	0	73.3	20.0	80.0
12	2.0	0.5	0	0	80.0	10.0	80.0
13	2.0	1.0	0	0	76.7	26.7	83.3
14	1.0	2.0	0	0	66.7	26.7	93.3
15	3.0	2.0	0	0	86.7	16.6	76.7
16	0	1.0	0	0	3.3	0	13.3
17	2.0	2.0	1.0	0	93.3	33.3	96.7
18	0	1.0	0	0.2	0	0	0
19	1.0	0.5	0	1.0	20.0	3.3	33.3
20	0	0	0	2.0	0	0	0

接种外植体数均为30

2.2 不同消毒时间的消毒效果 见表2。由表2可知,5 min消毒时间时尽管茎尖、幼叶和幼茎3种外植体当时生长正常,但由于其较高的污染率,很难保证以后愈伤组织具有良好的生长状况;浸泡15

min可以保证低污染率,但会使一些细胞活力丧失,甚至死亡。10 min消毒基本上可以保证低污染率和外植体正常的生长状况。

表2 不同消毒时间的消毒效果

消毒时间/min	外植体类别	污染数/块	污染率/%	外植体生长情况
5	茎尖	0	0	正常
	幼茎	2	6.7	正常
	幼叶	4	13.3	正常
10	茎尖	0	0	正常
	幼茎	0	0	正常
	幼叶	0	0	正常
15	茎尖	0	0	正常
	幼茎	0	0	部分死亡
	幼叶	0	0	部分死亡

接种外植体数均为9

此外,本研究预实验中选用2a生老叶及老茎作为外植体,结果显示出愈率为零。且以老茎为外植体不能保证较低的污染率。

总之,中国粗榧的愈伤组织诱导应选择当年生茎尖和幼茎作为外植体;比较理想的外植体消毒方法是外植体经过清水冲洗后,先在0.2 g/L新洁尔灭溶液中浸泡10 min,无菌水冲洗3遍后,再用1.0 g/L升汞浸泡10 min,无菌水冲洗3遍后即可用于接种;培养基选用MS+6-BA+NAA+2,4-D(6-BA、NAA浓度均为2.0 mg/L,2,4-D浓度为1.0 mg/L)转为合适。

参考文献

- 何洪源. 中国粗榧果实和枝叶中三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱分离方法的研究. 中草药, 2001, 32(3): 201
- 符文英, 杜道林, 符木均. 海南粗榧愈伤组织的诱导和培养. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 34
- 高莉萍, 包满珠. 月季“萨蔓莎”愈伤组织的诱导及植株再生. 园艺学报, 2005, 32(3): 534
- 朱蔚华, 陆俭, 李新兰, 等. 几种红豆杉植物愈伤组织诱导培养的观察. 中药材, 1991, 14(9): 5
- 梅兴国, 温川蓉, 刘凌, 等. 红豆杉离体胚培养快速育苗研究. 华中理工大学学报(自然科学版), 1998, 26(5): 5

(2005-10-25 收稿 责任编辑徐春燕)