

给新疆畜牧业带来巨大危害,但它也是哈萨克医生的常用药材,我们对醉马草的这些前期的研究就是希望能准确鉴定出它的有毒物质成分,并能为合理开发治理醉马草提供科学依据。

表 3 测总碱含量 $L_9(3^4)$ 正交实验表及结果

Table 3 The total alkaloids content and result of orthogonal design experiment						
序号	浸提时间	乙醇浓度	溶媒量	浸提温度	总碱含量(mg)	OD 值
1	1	1	1	1	2.22	0.101
2	1	2	2	2	2.31	0.152
3	1	3	3	3	2.36	0.211
4	2	1	2	3	2.49	0.491
5	2	2	3	1	2.47	0.425
6	2	3	1	2	2.43	0.389
7	3	1	3	2	2.57	0.647
8	3	2	1	3	2.58	0.690
9	3	3	2	1	2.53	0.583

表 4 总碱含量 $L_9(3^4)$ 方差分析表

Table 4 The total alkaloids content and table of analysis						
方差来源	平方和(总碱含量OD值)	自由度	方差(总碱含量与OD值)	F 值(总碱含量)	F 值(OD值)	
A	0.106	0.356	2	0.053	0.178	3.563 *
B	0.001	0.001	2	0.0005	0.0005	0.034
C	0.005	0.002	2	0.0025	0.001	0.168
D	0.007	0.014	2	0.0035	0.007	0.235
SSe	0.12	0.37	8	0.015	0.04625	

3.2 春季采集的醉马草材料与秋季采集的材料相比,春季材料具有显著的生物碱沉淀反应和比较弱的黄酮反应;而秋季采集的醉马草材料与春季草料相比,秋季材料具有显著的黄酮反应和非常弱的生物碱沉淀反应。另外通过镜检,在醉马草生长旺盛时期,其体内的内生真菌的菌丝生长也比较旺盛,此后观察到的内生菌丝量明显减少,此结果与我们检测到的生物碱含量与内生菌的活动一致;醉马草的有毒成分主要集中在春季采集的苗期材料的亲水部位。该部位主要含有生物碱、氨基酸、糖类物质,而秋季材料当中也含有氨基酸和糖类物质,经毒理实验证明它们不是有毒物质,因此生物碱才是醉马草有毒物质。由此推断,醉马草内生菌在春季活动旺盛,导致有毒生物碱大量积累,而其它季节醉马草生物碱含量很少,因此也很少有家畜醉马草中毒的报道,这一结果与春季常报道的家畜醉马草中毒事件相符。

3.3 因为对醉马草有毒生物碱成分的性质还不了解,而不同

来源的总生物碱的最大紫外吸收波长有所不同,如果使用其他生物碱的最大吸收波长去测量的话,结果不是很准确,因此通过醉马草总生物碱全紫外(190~400nm)波长扫描,确定最佳测定醉马草总生物碱含量的波长为 196nm、274nm 和 340nm,其中 196nm 处的吸收峰对总生物碱的含量影响最大。同时我们又通过常用的酸碱滴定法^[11]测定其总碱的含量,其结果是一致的。另外,通过紫外 190~400nm 波长扫描实验发现醉马草总生物碱在 196nm、274nm 和 340nm 始终有三个峰,含量不同这三个波长下的 OD 值都有所变化,本文使用这三个 OD 值的平均数作为测量值。

3.4 本文提取醉马草总生物碱的实验路线,即选择乙醇做提取溶剂、732 强酸性阳离子树脂吸附、正丁醇萃取等实验步骤是在多次实践的基础上确定的。因素的设计也是通过反复实验力求把主要影响因素都考虑在内,比如首先比较了三种方法对比提取醉马草总生物碱的效率,其中材料是幼嫩叶组织,可能是超声波法没能显示出明显优势的原因;没有选择酸性条件下提取生物碱就是因为它对提取率的影响不大;乙醇的浓度设计在 0~95% 是因为醉马草的生物碱多为水溶性,所以也考虑到用水提取是否合适;醉马草为草本植物,因此材料的吸湿性比较强,所以我们选择的溶媒量比较大,尤其是第一次煎煮加的量比较多;此外我们通过检测发现醉马草在生长过程中生物碱含量的变化非常大,但在苗期生物碱含量比较高,所以实验用的材料都是采自春季苗期的醉马草。

参考文献:

[1]史志诚,等.中国草地重要有毒植物[M].中国农业出版社,1987:166-176.
[2]于振田.醉马草的防治及开发利用[J].新疆畜牧业,1993,4:20-23.
[3]Bacon C W. Toxic endophyte - infected tall fescue and rene grasses: Historic perspectives[J]. J. Anim. Sci., 1995, 73: 861-870.
[4]李云森,陈子君,王峰涛.从有毒植物中开发新药的探讨[J].中草药,2002,33(5):476-477.
[5]于振田.醉马草的防治及开发利用[J].新疆畜牧业,1993,4:20-23.
[6]阙毓铭,黄泰康,等.中药化学实验操作技术[M].中国医药科技出版社,1993,12.
[7]国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].2000 年版二部附录 XI C.北京:化学工业出版社,2000.
[8]李姿娇,杨屹,丁明玉,等.麻黄非麻黄碱部分中黄酮、生物碱和有机的分析[J].分析实验室,2005,(4):67-69.
[9]单宇,王鸣,冯煦,等.小麦麸皮中总黄酮的最佳提取工艺[J].中药材,2005,28(3):223-225.
[10]北京中医学院.中药化学[M].上海人民出版社,1976.

均匀设计法优化黄芩愈伤组织培养基

李康,张东向*,张磊,陈贺

(齐齐哈尔大学生命科学与工程学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:目的:优化黄芩愈伤组织培养条件。方法:采用均匀设计法,以黄芩甙含量为主要考察指标,对黄芩愈伤组织生长的 MS 培养基成分进行多因素多水平考察。结果:最佳培养基为 MS 附加 0.25mg/L NAA、0.5mg/L 6-BA、17g/L 葡萄糖和 35g/L 蔗糖。最佳培养基黄芩甙含量为 27.44mg/gDW。结论:用均匀设计法优化愈伤组织培养基省时、方便,且最佳培养基黄芩甙含量与预测值相近,且明显高于均匀设计实验方案中的黄芩甙含量。经 SAS 软件分析得出的优化方程拟合度很好。

关键词:黄芩;愈伤组织;均匀设计;黄芩甙

中图分类号:Q813.1*2 文献标识码:A 文章编号:1004-311X(2006)06-0062-03

Optimization of Medium for *Scutellaria Baicalensis Georgi* Callus by Uniform Design

Li Kang, ZHANG Dong - xiang*, ZHANG Lei, CHEN He

(College of Life Science and Technology, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract: Objective: To optimize the medium for *Scutellaria Baicalensis Georgi* callus. Methods: The components of MS medium for growth of callus were investigated from poly - factors and poly - levels by uniform design. Baicalin content was chosen as the main experiment index. Results: The optimum medium was MS added 0.25mg/L NAA, 0.5mg/L 6 - BA, 17g/L glucose and 35g/L sucrose. The optimum baicalin content was 27.44 mg/gDW. Conclusion: Uniform design is a saving, convenient method for the optimization of medium for callus. The optimum medium had the similar baicalin content to the expected and more than that of the arrangements in uniform design. The optimization equation obtained by the SAS was fit for the experiment.

Key words: *Scutellaria Baicalensis Georgi*; callus; uniform design; baicalin

中药黄芩为唇形科植物黄芩 (*Scutellaria Baicalensis Georgi*) 的干燥根。具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎等功效^[1]。其主要成分黄芩甙 (baicalin, Bai) 及黄芩素等具有抗氧化、抗菌、抗肿瘤、抗病毒、抗 HIV 及清除氧自由基和治疗心血管疾病等作用^[2], 医药行业对其需求越来越大。但由于连年破坏性的采挖和黄芩人工种植周期较长, 黄芩资源日益匮乏, 已不能满足市场的需要。近年来, 植物组织培养技术在保护药用植物野生资源、生产药物有效成分方面发挥了重要的作用。吴晓玲^[3]等的研究表明: 黄芩真叶是诱导愈伤组织的最佳外植体; 黑暗条件适合于愈伤组织的诱导, 而且组织疏松适合于细胞培养; 0.5mg/L 2, 4-D + 1.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L NAA 是最佳的愈伤组织诱导激素配比。任振兴^[4]等利用 HPLC 法测定了黄芩愈伤组织中黄芩苷的含量并对愈伤组织生长和黄芩苷生成的稳定性进行了初步研究。而利用均匀设计法优化黄芩愈伤组织生长培养基目前未见报道。本文采用均匀设计法研究四因素 (NAA、6-BA、葡萄糖、蔗糖)、六水平 MS 培养基成分分配比对黄芩愈伤组织生长及黄芩甙含量的影响。旨在找出黄芩愈伤组织培养的最佳条件, 为黄芩悬浮细胞培养大量生产有效药用成分提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

黄芩种子购于河北省安国市药材市场。

1.1.2 试剂

MS 培养基所用的蔗糖、葡萄糖购于天津市凯通化学试剂有限公司。黄芩甙标准品购于昆明风山浙医药研究有限公司。

1.1.3 仪器

HP1500GS-B 型全智能人工气候植物箱, UV755B 型紫外可见分光光度计。

1.1.4 培养基

附加不同浓度碳源和激素的 MS 培养基。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织诱导

选取籽粒饱满的黄芩种子。用 40mg/L 赤霉素 (GA₃) 溶液浸泡 12h, 打破种子休眠。然后均匀播种于温室育苗盆中。(25±1)℃ 培养。待苗长到 5~7cm 时, 选取根为外植体, 参照张东向^[5]的方法将无菌外植体接种于附加 0.2mg/L 2, 4-D 和 2.0mg/L 6-BA 的 MS 培养基中 (蔗糖 3%, 琼脂 1%, pH5.8), (25±1)℃ 暗培养诱导愈伤组织。

1.2.2 愈伤组织继代培养

选取疏松的淡黄色的愈伤组织作为继代培养的材料。3w 继代一次。选取继代 3~4 次的愈伤组织按照 1.2.3 设计方案, 分别接种于 6 种组合的 MS 培养基中。重复 3 次。(25±1)℃, 2 000lx 光照培养。

1.2.3 实验设计

采用 U₆(6⁴) 均匀设计表^[6]。选取 NAA、6-BA、葡萄糖、蔗糖作为参选因素 (分别标记为 A、B、C、D)。因素、水平安排见表 1。

1.2.4 生理生化指标测定

1.2.4.1 标准曲线绘制

标准曲线绘制参照韩会玲^[7]的方法。当黄芩甙标准品浓度在 0~60μg/mL 范围内时, 标准品浓度 C (μg/mL) 与吸光值 A 呈良好的线性关系, 符合朗伯-比尔定律。用最小二乘法^[8]

进行线性回归得标准方程为: $C = 20.193A - 1.2387$ ($r = 0.998$)。

表 1 U₆(6⁴) 均匀设计因素、水平表

Table 1 The selection of factors and levels in uniform design

水平	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	葡萄糖 (g/L)	蔗糖 (g/L)
1	0.01	0.5	0	20
2	0.05	1.0	5	25
3	0.10	1.5	10	30
4	0.15	2.0	15	35
5	0.20	2.5	20	40
6	0.25	3.0	25	45

1.2.4.2 细胞鲜重、干重测定

愈伤组织鲜重直接在无菌万分之一电子天平上称取。鲜培养物 60℃ 烘至恒重, 测干重。

1.2.4.3 黄芩甙含量测定

细胞培养物 60℃ 烘至恒重, 研成粉末, 50 目筛网过筛。称取适量干燥的细胞培养物, 加入 50% 乙醇, 50℃ 温浴 5~6h。冷却后用 50% 乙醇定容。摇匀, 静置澄清后取 1mL 上清液用蒸馏水稀释适当倍数, 摇匀, 作为待检样。用 UV755B 型紫外-可见分光光度计测定 278nm 处光密度 (OD) 值。取 50% 乙醇 1mL 加蒸馏水稀释与待检样相同倍数后作对照。依据标准曲线方程计算黄芩甙浓度 C。根据下式计算每克干培养物 (gDW) 中黄芩甙的含量 Y (mg)。

$$Y(\text{mg/gDW}) = (C \times \text{稀释倍数} \times \text{提取介质体积}) / \text{培养物干重}$$

2 结果与分析

2.1 培养基对愈伤组织生长及黄芩甙含量的影响

按照均匀设计方案将继代培养的黄芩愈伤组织接种于附加不同浓度 NAA、6-BA、葡萄糖和蔗糖的 MS 培养基中。培养 3w 后, 测定各组合愈伤组织干重及黄芩甙含量。由表 2 可知, 组合 1 的愈伤组织干重较低, 但黄芩甙的含量明显高于其它组合。组合 2 的愈伤组织干重及黄芩甙含量在 6 个组合中都是最低的。植物次级代谢产物往往是植物在逆境胁迫, 缓慢甚至停止生长下产生的。综合分析后我们认为, 组合 1 有利于愈伤组织中黄芩甙的积累。

表 2 均匀设计方案及实验指标测定结果

Table 2 The uniform design and the results of the experiment

编号	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	葡萄糖 (g/L)	蔗糖 (g/L)	干重 (g/瓶)	Bai 含量 (mg/gDW)
1	0.01	1.0	10	45	0.1338 ± 0.0036	25.40 ± 0.822
2	0.05	2.0	25	40	0.0507 ± 0.0092	10.12 ± 0.562
3	0.10	3.0	5	35	0.1664 ± 0.0042	19.98 ± 0.286
4	0.15	0.5	20	30	0.1442 ± 0.0120	18.97 ± 0.147
5	0.20	1.5	0	25	0.1391 ± 0.0130	15.19 ± 0.282
6	0.25	2.5	15	20	0.1508 ± 0.0085	15.86 ± 0.503

2.2 逐步回归分析^[9]

在实验设计时假定各因素间不存在交互作用。但分析结果时, 必须考虑各因素间的交互作用。由于因素间的一级交互作用是主要的交互作用, 故主要考虑 A × B、A × C、A × D、B × C、B × D、C × D 的交互作用, 即考虑二次逐步回归模型。模型表达式为:

$$Y = a_0 + a_1 \times A + a_2 \times B + a_3 \times C + a_4 \times D + a_5 \times A^2 + a_6 \times A \times B + a_7 \times A \times C + a_8 \times A \times D + a_9 \times B^2 + a_{10} \times B \times C + a_{11} \times B \times D + a_{12} \times C^2 + a_{13} \times C \times D + a_{14} \times D^2$$

其中 a_0 为常数项, $a_1, a_2, \dots, a_{14}$ 为待估参数。

用 SAS 软件以黄芩甙含量为考察指标进行逐步回归分析, 得优化方程:

$$Y = -0.06407C^2 + 2.396A \times C - 0.1554B \times C + 0.03782C \times D + 15.12$$

($R = 0.9998, P = 0.01$)。

收稿日期: 2006-06-15; 修回日期: 2006-09-05

基金项目: 黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力计划项目资助 (No. 1054G066)

作者简介: 李康 (1982-), 男, 山西人, 在读硕士, 从事植物细胞工程和次生代谢调控方面的研究, E-mail: likang-82@163.com; * 通讯作者 (Corresponding author)。

根据优化方程和实际经验得出最佳 MS 培养基配比为: A = 0.25mg/L, B = 0.5mg/L, C = 17g/L, D = 35g/L。

2.3 验证实验

按照均匀设计所得的最佳条件取 A = 0.25mg/L, B = 0.5mg/L, C = 17g/L, D = 35g/L 进行 3 次实验, 优化方程的指标预测值为 27.97mg/gDW。实验指标值分别为 28.25mg/gDW、26.65mg/gDW、27.43mg/gDW, 平均值为 27.44mg/gDW。实验指标平均值与指标预测值很接近, 且明显优于均匀设计实验方案中的指标值。说明均匀设计选出的最优条件具有良好的重现性。

3 讨论

近年来, 研究者主要在黄芩栽培、生物学特性^[10]、组织培养与快速繁殖^[11]、黄芩甙含量测定^[12]、黄芩药理作用^[13]、黄芩甙提取和精制工艺^[14-15]、分子生物学^[16]等方面开展了相关的工作。但利用植物组织培养技术来生产黄芩有效成分黄芩甙的报道很少。

植物组织培养过程中, 激素种类、浓度及其配比对于协调细胞生长、分化和代谢起重要作用。任振兴^[4]等研究发现以黄芩茎为外植体接种于附加 0.2mg/L IAA 和 2.0mg/L 6-BA 的 MS 培养基上容易诱导出疏松的愈伤组织。而我们在研究中发现, 以根为外植体, 以 0.2mg/L 2,4-D 代替 0.2mg/L IAA 同样可以诱导出疏松的愈伤组织。糖类在组织培养过程中, 除作为碳源为细胞提供合成新化合物的碳骨架及能源外, 还起到维持细胞渗透压的作用。

均匀设计法选取的实验点在实验范围内充分的“均匀分散”, 为科研和生产中最佳配比、最佳工艺条件选择等提供了一个很好的工具, 能起到节省人力、物力的作用^[17]。李展^[18]等利用均匀设计法优化了黄芩甙的提取工艺, 罗云^[19]等利用均匀设计法筛选出了银黄分散片的最佳处方。本研究采用均匀设计法筛选出最佳的培养基为 MS 附加 0.25mg/L NAA、0.5mg/L 6-BA、17g/L 葡萄糖和 35g/L 蔗糖。最佳培养基黄芩甙含量为 27.44mg/gDW, 这与任振兴^[4]等通过 HPLC 测定的继代 8 次的黄芩愈伤组织中黄芩甙含量 (27.3mg/gDW) 基本一致。而且经过验证实验, 优化方程的拟合度很好, 能通过相关参数来推测目的组分的含量, 这将为稳定的高产黄芩甙愈伤组织固体培养体系的建立提供参考。

在植物组织培养过程中, 愈伤组织的遗传稳定性是值得人们关注的问题^[20]。在研究中我们发现在继代过程中愈伤组织的生长和产物的合成不稳定。如何通过培养条件的优化使

愈伤组织向着目的组分含量高的方向发展是我们下一步工作亟待解决的问题。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典一部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 211-212.
- [2] 杨娟, 傅军鹏. 黄芩活性成分及药效研究近况 [J]. 实用医药杂志, 2004, 21(3): 271-273.
- [3] 吴晓玲, 胡海英, 邓光存, 等. 黄芩愈伤组织诱导条件的研究 [J]. 生物技术, 2005, 15 (2): 77-79.
- [4] 任振兴, 王梦亮, 刘滇生. 黄芩愈伤组织的诱导培养及其黄芩甙的含量测定 [J]. 山西大学学报, 2006, 29(1): 82-85.
- [5] 张东向. 培养条件对齿瓣延胡索愈伤组织生长及延胡索乙素含量的影响 [J]. 植物研究, 2003, 23(1): 86-90.
- [6] 方开泰, 王元. 均匀设计与均匀设计表 [M]. 北京: 科学出版社, 1994: 12-15.
- [7] 韩会玲, 宋小妹, 张选军. 黄芩甙提取工艺的改进 [J]. 陕西中医学院学报, 1997, 20(4): 35-36.
- [8] 杜荣寿. 生物统计学 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2003: 148-149.
- [9] 王秀芳, 李悦. 均匀设计法在植物组织培养外植体消毒中的应用 [J]. 防护林科技, 2003, 55(2): 6-7.
- [10] 陈君, 杨世林, 程惠珍. 不同种源黄芩生长发育特性初步观察 [J]. 中药材, 2002, 25(11): 777-778.
- [11] 高山林, 陈柏君. 黄芩组织培养快速繁殖技术的优化 [J]. 中草药, 2004, 35(3): 312-315.
- [12] 赵世初, 王连心, 洪志强, 等. 黄芩甙提取和测定方法研究 [J]. 中医药学刊, 2006, 24 (3): 433-435.
- [13] 迟戈夫, 丁丽, 常丽敏. 目前国内黄芩药理研究进展 [J]. 内蒙古民族大学学报, 2005, 20(2): 207-209.
- [14] 刘峰, 王小平, 白吉庆. 黄芩中黄芩甙的提取工艺研究 [J]. 西北药学杂志, 2005, 20(2): 250-251.
- [15] 张福维, 林春, 关崇新. 黄芩甙提取工艺研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 295-297.
- [16] 邵爱娟, 李欣, 黄璐琦, 等. 不同种源黄芩的 RAPD 分析 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (6): 452-455.
- [17] 王海波, 沙明, 邱学. 均匀设计法与正交设计法在复方工艺中应用比较 [J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32(1): 71-72.
- [18] 李展, 高微微, 林文卫, 等. 均匀设计法优化黄芩提取工艺 [J]. 中草药, 2001, 32(7): 606-607.
- [19] 罗云, 李荣凌, 何文, 等. 银黄分散片的制备及质量控制 [J]. 广东药学院学报, 2004, 20 (2): 117-119.
- [20] 李波. 植物组织培养基本技术 [M]. 哈尔滨: 哈尔滨地图出版社, 2002: 78-80.

巴西彩龟与中华鳖消化道嗜银细胞的观察

楚德昌, 邓振旭, 李春华
(菏泽学院, 山东 菏泽 274015)

摘要:目的: 探索爬行动物消化道嗜银细胞形态与分布。方法: 以改良龙挂开银染法对中华鳖 (*Trionyx sinensis*)、巴西彩龟 (*Trachemys scripta*) 消化道嗜银细胞进行染色与显微观察。结果与结论: 两种动物消化道从食管至大肠均有嗜银细胞分布, 分别在胃幽门和十二指肠处有明显的分布密度高峰, 并分别在大肠始段和小肠末段有次分布密度高峰, 巴西彩龟在食管还有第三分布密度高峰。嗜银细胞多数呈毛笔头样、高脚杯状、锥体形、椭圆形、长梭形等。多数嗜银细胞有明显的突起伸向管腔方向, 少量嗜银细胞有突起伸向固有膜或其周围, 并可见这些突起处有释放的分泌颗粒, 这提示消化道内分泌细胞有内分泌、旁分泌和腔分泌功能, 腔分泌功能可能是更主要的分泌方式。

关键词: 爬行动物; 消化道; 嗜银细胞; 中华鳖; 巴西彩龟

中图分类号: Q954.58; Q954.6-33 文献标识码: A 文章编号: 1004-311X(2006)06-0064-03

Observation of Argyrophil Cells in Digestive Tube of *Trachemys scripta* and *Trionyx sinensis*

CHU De-chang, DENG Zhen-xu, LI Chun-hua
(Heze University, Heze 274015, China)

Abstract: **Objective:** To study distribution and morphology of argyrophil cells in the digestive tract of reptiles. **Methods:** With the help of improved Long's silver impregnation method, argyrophil cells in the digestive tract of *Trionyx sinensis*, *Trachemys scripta* were observed. **Result and Conclusion:** Argyrophil cells' distribution is throughout the digestive tract of two kinds animal, from esophagus to rectum, with the highest density in the pars pylorica and duodenum, and the second highest density in the front of intestinum tenue and last part of intestinum crassum, respectively. Moreover, there is a third highest density in the esophagus of *Trachemys scripta*. Argyrophil cells appear in the shape of goblet, head of