

- [8] FERREIRA A J, SANTOS R A. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7)[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2005, 38(4):499-507.
- [9] CRACKOWER M A, SARA O R, OUDIT G Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function[J]. *Nature*, 2002, 417(6891):822-828.
- [10] OUDIT G Y, CRACKOWER M A, BACKX P H, et al. The role of ACE2 in cardiovascular physiology [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, 13(3):93-101.
- [11] IYER S N, AVERILL D B, CHAPPELL M C, et al. Contribution of angiotensin-(1-7) to blood pressure regulation in salt-depleted hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 2000, 36(3):417-422.
- [12] HUENTELMAN M J, GROBE J L, VAZQUEZ J, et al. Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats[J]. *Exp Physiol*, 2005, 90(5):783-790.
- [13] BURRELL L M, RISVANIS J, KUBOTA E, et al. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans[J]. *Eur Heart J*, 2005, 26(4):369-375.
- [14] DONOGHUE M, WAKIMOTO H, MAGUIRE C T, et al. Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35(9):1043-1053.
- [15] LI N, ZIMPELMANN J, CHENG K, et al. The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288(2):F353-362.
- [16] TIKELLIS C, JOHNSTON C I, FORBES J M, et al. Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy[J]. *Hypertension*, 2003, 41(3):392-397.
- [17] YE M, WYSOCKI J, NAAZ P, et al. Increased ACE2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice: a renoprotective combination? [J]. *Hypertension*, 2004, 43(5):1120-1125.
- [18] GILBERT R E, KRUM II, WILKINSON-BERKA J, et al. The renin-angiotensin system and the long-term complications of diabetes: pathophysiological and therapeutic considerations[J]. *Diabet Med*, 2003, 20(8):607-621.
- [19] LI W, MOORE M J, VASILIEVA N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus[J]. *Nature*, 2003, 426(6965):450-454.
- [20] HUANG L, SEXTON D J, SKOGERSON K, et al. Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(18):15532-15540.
- [21] HUENTELMAN M J, ZUBCEVIC J, HIERNANDEZ PRADA J A, et al. Structure-based discovery of a novel angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor[J]. *Hypertension*, 2004, 44(6):903-906.
- [22] ZHONG J C, HUANG D Y, YANG Y M, et al. Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 by all-trans retinoic acid in spontaneously hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 2004, 44(6):907-912.
- [23] HE Y, ZHU Q, LIU S, et al. Identification of a critical neutralization determinant of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus; importance for designing SARS vaccines[J]. *Virology*, 2005, 334(1):74-82.

(收稿日期:2005-08-08)

## 植物组织和细胞培养物中黄酮类物质积累影响因素的研究进展

李燕,王春兰,郭顺星\*,肖培根(中国医学科学院-中国协和医科大学药用植物研究所,北京 100094)

**摘要:**目的 总结植物组织和细胞培养物中黄酮类物质积累影响因素的研究进展。方法 查阅国内外近 10 年来的 30 篇相关文献,并加以分析评述。结果 植物组织和细胞培养物中黄酮类物质的积累受到营养条件如培养基种类,培养基中碳源、氮源、大量营养元素、植物激素,物理条件如光照、细胞聚集体积及剪切力,以及不同细胞系等多方面因素的影响。结论 在植物组织和细胞培养物中黄酮的合成受多方面因素影响;而且欲从不同植物的组织或细胞培养物中得到最佳黄酮产量,需对不同植物的组织或细胞培养的最佳条件进行系统研究。

**关键词:**植物组织培养;植物细胞培养;黄酮类物质积累;影响因素

**中图分类号:**R284 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-2494(2006)09-0651-05

植物中含有丰富多样的次生代谢产物,是药物来源的天然宝库。目前从植物中筛选新药是一个非常活跃的研究领域,通过从植物中分离提取纯天然有效部位或单体化合物,只适用于易栽培、繁殖快的植物,而对生长周期长、不易栽培及资源严重匮乏的植物如红豆杉(*Taxus sp.*),用直接提取来生产紫杉醇会造成对红豆杉树种的毁灭性破坏。加之许多次生代谢产物人工合成困难,市场需求大,因此通过细胞培养技术提高次生代谢物产量,具有特殊的理论意义和应用价

值。

现代药理研究表明,黄酮类化合物具有抗氧化活性、雌激素样作用、抗肿瘤作用、抗菌活性和保肝等作用;并且该类化合物是多种药用植物的有效成分,如银杏(*Ginkgo biloba*)、葛根(*Pueraria sp.*)、野甘草(*Scoparia dulcis*)、雪莲(*Saussurea sp.*)及水飞蓟(*Silybum marianum*)等都以黄酮为主要活性物质<sup>[1]</sup>。目前,有关植物细胞培养与组织培养生产黄酮类化合物的研究有很多报道,笔者综述了近 10 年来植物细胞培养

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30270148);国家杰出青年科学基金资助项目(30325047)

**作者简介:**李燕,女,硕士 \*通讯作者:郭顺星,男,研究员,博士生导师 Tel:(010)62829619 E-mail: sxguo2006@yahoo.com.cn

与组织培养中黄酮类物质积累影响因素的研究进展。为今后生物合成黄酮类化合物和珍稀濒危药用植物资源再生的研究提供参考。

## 1 培养基的种类

李茂寅发现含高浓度  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  的培养基较适合水母雪莲 (*Saussurea medusa* Maxim) 细胞的生长及黄酮的形成,通过对 MS 培养基进行优化,得到更适合水母雪莲细胞生长和黄酮形成的 MC 和 MP 培养基<sup>[2]</sup>。对于银杏愈伤组织培养而言,White 培养基不利于其细胞生长,却有利于黄酮苷的合成;而 MT 培养基有利于愈伤组织的生长,易获得较高的愈伤组织生物量,但黄酮的含量低<sup>[3]</sup>,可见不同类型的培养基对植物培养中细胞的生长和次生代谢产物的形成有很大的影响。为此,选择既适合植物细胞生长,又有利于目标次生代谢产物合成的培养基是成功的关键所在。

银杏的愈伤组织在 MS 培养基上生长时,形成分散性良好的松软愈伤组织,但黄酮苷含量低;B<sub>5</sub>, SH 培养基有利于银杏细胞合成黄酮苷,并且愈伤组织生长较快,但结构较致密,分散性不好,不宜用作银杏悬浮培养的培养基<sup>[4]</sup>。说明选择培养基的类型不仅要考虑其对细胞生长率和黄酮产量的影响,还要考虑培养基对细胞生长状态的影响。

## 2 培养基中的各种营养

### 2.1 碳源

在银杏<sup>[5]</sup>的悬浮细胞培养和水母雪莲<sup>[6]</sup>愈伤组织培养中,蔗糖最有利于黄酮类成分的积累,若将蔗糖与葡萄糖组合作为碳源,效果好于单独以蔗糖为碳源;在银杏的悬浮细胞培养中还发现,碳源中添加葡萄糖有利于防止细胞的褐化现象。可见在植物组织和细胞培养中,将不同的碳源进行组合可能会得到比较理想的结果。

水母雪莲的愈伤组织在悬浮培养方式下,蔗糖最适质量浓度为  $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[6]</sup>;而在固体的 MS 培养基上培养时,  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的蔗糖质量浓度既利于水母雪莲愈伤组织生长又利于黄酮形成,在该蔗糖质量浓度下水母雪莲的愈伤组织的黄酮产量分别是蔗糖质量浓度为 10 和  $45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 3.3 倍和 1.9 倍。当总糖质量浓度超过  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,黄酮合成受到强烈抑制<sup>[2]</sup>,表明同一种植物组织在不同的培养形式下,培养体系中碳源的最佳加入量也不相同。

在对草莓 (*Fragaria ananassa*) 的悬浮细胞培养研究中,发现培养基中随蔗糖或甘露醇的浓度升高,培养基的渗透压和黏度增加,其结果是阻止了草莓悬浮细胞对营养物质的摄取,表现为抑制细胞的生长;而较高的渗透压则提高了草莓细胞中花色素的含量,花色素含量的增加是细胞生长抑制的结果<sup>[7]</sup>。而在另外的报道中,较高的初始蔗糖浓度使渗透压保持一定的水平,有利于促进香身草 (*Perilla frutescens*) 细胞中花色素的合成;在相当高的蔗糖浓度下细胞的生长没有受到抑制<sup>[8]</sup>。说明不同种类的植物细胞对渗透压的耐受性和反应不同,而碳源对培养基的渗透压影响较大,所以在进行植物细胞的悬浮培养时应根据具体情况调整培养基中碳源的浓度。

### 2.2 氮源

水母雪莲细胞在固体 MS 培养基中培养时,当铵态氮与硝态氮比例为 1:5,总氮浓度为  $0.04 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,水母雪莲愈伤组织生长量和黄酮类化合物产量最高,其细胞生物量分别是其他比例下的 1.0~2.4 倍,而黄酮产量则是其他比例下的 1.1~7.2 倍;当铵态氮与硝态氮比例相同时,氯化铵和硝酸钾为氮源比硝酸铵和硝酸钾为氮源更有利于愈伤组织生长和黄酮类化合物的形成<sup>[2]</sup>;而在其悬浮培养中,当铵态氮与硝态氮的比例为 20:40,氮源总浓度在  $60 \sim 120 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,细胞生长量和黄酮合成量均较高,分别为  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  左右<sup>[9]</sup>。在草莓的悬浮细胞培养中,发现没有铵态氮存在时,细胞中花色素的含量很低;没有硝态氮存在时,细胞的生长停止,也没有花色素的合成<sup>[7]</sup>。可见,在草莓细胞培养中铵态氮影响花色素的合成,而硝态氮影响细胞的生长。

如上所述,细胞的生长及黄酮的合成不仅与总氮浓度有关,而且与氮源种类及不同类型氮源的比例有关,即使同一种植物组织在不同的培养体系中,对氮源的需求也不尽相同。要得到最佳的细胞生长和最高的黄酮产量,氮源的组成和浓度是重要的影响因素之一。

### 2.3 大量营养元素

**2.3.1 钙** 在水辣蓼 (*Polygonum hydropiper*) 细胞悬浮培养中,当  $\text{CaCl}_2$  浓度超过  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,细胞生长受到抑制<sup>[10]</sup>。而钙浓度在  $3 \sim 20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  内,对水母雪莲细胞 (TUIP-8) 生长无抑制作用,低于  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,细胞的生长和黄酮的合成明显受到抑制<sup>[11]</sup>。说明钙离子浓度过高或过低都会影响植物细胞的生长,并且不同植物细胞对钙离子浓度的耐受性不同。

**2.3.2 磷** 在水母雪莲的悬浮培养中,磷的最适浓度范围是  $1.25 \sim 2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,低于  $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时细胞生物量和黄酮合成量急剧下降<sup>[11]</sup>。在草莓的悬浮细胞培养中发现,当磷酸盐浓度低于  $0.63 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  抑制细胞生长时,能增加细胞中花色素的含量;在  $0.16 \sim 0.31 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  之间时,花青素的含量明显升高,最高达  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  鲜重,但浓度大于  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,花青素的产量没有升高<sup>[7]</sup>。在银杏的愈伤组织培养中,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度与细胞生长率呈负相关,在  $0.82 \sim 1.64 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,黄酮醇糖苷含量保持在较高水平,高于或低于此浓度时,黄酮醇糖苷含量均下降<sup>[12]</sup>。可见不同植物的最适磷浓度的范围不同,磷浓度过高或过低都会降低细胞中黄酮类成分的积累。

**2.3.3 镁** 水母雪莲细胞悬浮培养时,当镁离子浓度低于  $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,细胞培养密度和黄酮产量迅速下降;而在  $1.5 \sim 6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  之间,细胞密度随镁离子的增加而略微增加,但黄酮含量有所降低<sup>[11]</sup>。在银杏的愈伤组织培养中,随着  $\text{MgSO}_4$  浓度的增加,细胞生长率和黄酮醇糖苷的含量呈同步变化,浓度为  $496 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (约  $5.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 时,细胞生长率和黄酮醇糖苷的含量均达最大值,分别为 350% 和  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  干重<sup>[12]</sup>。可见镁离子浓度的变化对不同植物细胞生

长率和黄酮类物质的含量影响不同。

**2.3.4 钾** 在水母雪莲细胞培养中,钾的最适浓度为  $18 \sim 24 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,过高或过低都会强烈抑制细胞的生长和黄酮的合成<sup>[11]</sup>。而在银杏的愈伤组织培养中, $\text{KNO}_3$ 浓度对细胞生长率影响不大,但对黄酮醇糖苷含量影响明显,如当 $\text{KNO}_3$ 浓度为  $2520 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,黄酮醇糖苷的含量是 $\text{KNO}_3$ 浓度为  $1900 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的2倍左右<sup>[12]</sup>。说明钾离子的浓度对植物细胞中黄酮类成分的合成影响较大。

#### 2.4 植物激素

培养基中附加植物激素下基腺嘌呤(BA)与NAA组合,银杏愈伤组织中黄酮含量最低,但细胞生物量最高,因而在一个培养单元中黄酮的总产率也最高;BA与2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)组合,则结果与此完全相反,且黄酮总产率也下降近1倍<sup>[3]</sup>。水母雪莲细胞培养物在培养基中BA浓度  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的情况下,随着添加的2,4-D浓度升高( $0.01 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),愈伤组织生长和黄酮形成受到抑制;而随着添加NAA浓度的升高( $0.01 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),愈伤组织生长量和黄酮产量有所增加,当NAA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时是2,4-D  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时黄酮产量的近2倍<sup>[2]</sup>。可见BA与NAA组合较有利于提高黄酮的产量。

银杏愈伤组织采用固体培养时,2,4-D抑制山柰酚的合成,而液体培养时,加入  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的2,4-D则有利于山柰酚的产生,但2,4-D为  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,山柰酚的含量随2,4-D浓度的增加而减少<sup>[13]</sup>。在草莓悬浮培养中,较低浓度的2,4-D能增强花色素甲基转移酶的活性,促进甲基化花色素的积累<sup>[14]</sup>。说明2,4-D浓度影响黄酮类成分的合成,并且对不同培养方式的植物细胞中的同一黄酮成分影响也不尽相同。

#### 2.5 诱导因子

在进行植物组织或细胞培养时,常利用微生物作为生物诱导子诱导黄酮的生物合成。如在鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)的根部共生菌中分离出的假单胞菌CRP55b及杆状菌CRS70,通过对该植物根的影响使其产生根瘤,显著提高鹰嘴豆黄酮类化合物的产量,作者认为细菌能产生促进植物根中黄酮合成的物质,而这些黄酮类化合物是在细菌存在的特定条件下被诱导而高水平合成的<sup>[15]</sup>。

各种化学和物理的诱导处理也被用到细胞培养中,来获得目标次生代谢产物的产生。用 $\text{CoCl}_2$ 和 $\text{NiCl}_2$ 作为化学诱导子,研究其对羊驴草(*Ononis arvensis*)细胞中黄酮的诱导作用发现,诱导因子的种类和诱导时间的不同会影响黄酮在植物培养组织中的积累<sup>[16]</sup>。向水母雪莲愈伤组织的固体培养基中添加 $\text{Ce}^{3+}$ 、 $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Nd}^{3+}$ 或稀有元素的混合物,能促进细胞的生长和黄酮的合成,作者推测稀有元素由于结构和性质与 $\text{Ca}^{2+}$ 非常相似,能与 $\text{Ca}^{2+}$ 竞争植物细胞膜蛋白上的结合位点,并影响细胞膜的功能,从而发挥作用<sup>[17]</sup>。以 $\text{AgNO}_3$ 及谷胱甘肽作为诱导剂,能刺激水母雪莲细胞中特定黄酮成分——jaceosidin和hispidulin的产量增加,最高分别比对照组高出2.6和2.5倍<sup>[18]</sup>。核黄素促进悬浮培养草莓细胞中花色素的合成,并能缩短细胞的培养时间<sup>[19]</sup>。还有学者通过诱

变处理来筛选黄酮高产系细胞株,如采用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线照射<sup>[20]</sup>或缺氧胁迫法<sup>[4]</sup>诱导出不同植物的高产黄酮细胞系。用真菌诱导子处理过的紫花苜蓿(*Medicago sativa*)细胞培养物,当甲基化抑制剂杀结核菌素存在时,会改变细胞中甲基转移酶的活性,降低异黄酮积累,使黄酮大量产生<sup>[21]</sup>。

另外研究认为,茉莉酮酸及其衍生物介入信号传导系统,该系统在植物防御性物质的生物合成中起到促进特殊酶的催化作用,外源性的茉莉酮酸及其衍生物能促进植物中某些防御性物质的产生<sup>[22]</sup>。在不同的实验中,用茉莉酮酸及其衍生物作诱导因子,能促进花色素的生物合成<sup>[22-23]</sup>,光照能增益其促进花色素合成的诱导作用,同时利用两种诱导因子共同处理好于单独处理的诱导效果;茉莉酮酸及其衍生物还能改变葡萄(*Vitis vinifera*)细胞中主要花色素组成成分(pe-onidin 3-glucoside)的含量,其原因可能是甲基转移酶的活性在培养的早期就被茉莉酮酸诱导到最高催化水平<sup>[23]</sup>。

黄酮是一种公认的植物抗毒素,当植物受到外界胁迫时被大量合成,利用生物或非生物因子诱导植物细胞产生大量的次生代谢产物,目前被广泛应用在细胞培养中,并且以上大量实验证明利用诱导因子诱导黄酮合成,是一种切实可行的方法,并且取得了很好的效果。

### 3 物理条件

#### 3.1 光照条件

大量文献报道,光照能促进植物细胞中黄酮的合成,光照培养的银杏愈伤组织黄酮含量(1.58%)显著高于暗培养愈伤组织(0.42%)<sup>[3]</sup>;在草莓的悬浮细胞培养中,花色素的含量随光照强度的增加而增加<sup>[7]</sup>。许多学者认为,光照对植物细胞中黄酮合成的诱导作用,与植物细胞苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性增加有关,PAL是黄酮生物合成过程中的一个关键酶,其活性增高,则促进黄酮的生物合成<sup>[24]</sup>。还有人认为光照触发了光感/光调系统,由于光感受器控制着与植物生长、次级代谢等有关基因的表达,光感受器接受光信号后,启动花色素生物合成基因的表达<sup>[25]</sup>。

在蓝光和白光处理下的水母雪莲愈伤组织随着每天光照时间的延长,PAL活性有很大提高,黄酮含量也随之增加;延长红光照射时间愈伤组织PAL活性和黄酮含量不断下降<sup>[24]</sup>。说明不同的光质及不同的处理时间对愈伤组织的生长、PAL活性及黄酮合成的影响不同。从大量实验可知,蓝光促进黄酮合成的作用最强,红光促进作用最弱,白光居中<sup>[24-25]</sup>。

一般认为,光照是黄酮产生的先决条件,但在FAW(*Fragaria ananassa* white)细胞培养过程中,分离出一种可以在暗培养条件下产生大量花色素的FAR(*Fragaria ananassa* red)细胞株,在光照条件下培养FAR细胞比暗培养时总花色素的产量低一半左右<sup>[26]</sup>。作者认为,FAW细胞在接种过程中发生基因突变,产生了FAR细胞,改变了花色素生物合成的途径,从而使FAR细胞在暗培养条件下产生大量的花色素。这对组织培养的大规模生产非常有益,既降低生产成本,又提高花色素的产量。

### 3.2 细胞聚集体体积及剪切力的影响

大量研究证明,植物细胞培养中细胞有形成聚集体的特性,形成聚集体有利于次生代谢产物的形成,当聚集体直径超出最佳范围时,则黄酮的合成降低<sup>[27-29]</sup>。原因是细胞的生长受生物信息的调节,这些信息通过胞间连丝传递,当细胞聚集体含有相当的细胞数量并形成较多的胞间连丝时,就越有利于次生代谢物的生成<sup>[27]</sup>,而细胞聚集体过大,又会导致聚集体内部细胞的营养缺乏,引起细胞褐化和死亡,从而影响细胞次生代谢物的生物合成<sup>[28]</sup>。所以细胞聚集体体积的分布范围影响着植物细胞的黄酮产量。

为防止聚集体的体积过大,在水母雪莲的细胞培养中利用气升式生物反应器,每间隔8 h将细胞培养物停止浸没10 min,得到最佳细胞聚集体的分布和最高的黄酮含量<sup>[28]</sup>。另有人通过改造反应器的搅拌桨<sup>[29]</sup>,降低生物反应器的剪切力对细胞的损害,以增加细胞聚集体的体积,促进黄酮的合成。由于聚集体大小与黄酮合成密切相关,较大的剪切力易使聚集体分裂,从而影响黄酮的产量,所以剪切力对植物细胞的生长和黄酮类化合物的合成有很大的影响。

### 4 高产细胞系的筛选

在悬浮培养过程中,很多植物细胞由于形态分化受到抑制或染色体发生变异,使目标产物含量降低甚至消失,因而选育生长性状稳定、次生代谢产物生产能力强的细胞系是实现细胞大规模培养的关键之一<sup>[4]</sup>。李春斌等<sup>[5]</sup>用12种银杏叶片分别诱导愈伤组织,发现来自黄酮含量高的外植体的组织培养物中黄酮含量也高,最大相差近4倍,即细胞培养物中黄酮含量与黄酮含量高或低的原植物成正相关性。因此,选育高产细胞系,应考虑细胞组织来源的影响。

目前,在很多实验中成功选育出高产细胞系,如利用缺氧胁迫法从银杏愈伤组织中选育出生产能力显著提高,且性状在继代过程中表现稳定的高产黄酮苷细胞系<sup>[4]</sup>;"3.1"项下提到的FAW细胞基因突变产生的FAR细胞,在暗培养条件下产生大量的花色素<sup>[26]</sup>。

### 5 其他影响因素

水母雪莲在放大罐培养时,接种量在 $4 \sim 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内,细胞生长良好,黄酮产量随接种密度增大明显增加;细胞内黄酮含量提高;超出此范围时,不利于细胞的生长和黄酮的合成<sup>[29]</sup>。在香身草细胞悬浮培养过程中,增加接种量可以提高花色素的产量,但当接种量超过 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,则不能再提高花色素的产量<sup>[8]</sup>。说明接种量的多少不仅对细胞的生长产生显著的影响,而且影响次生代谢产物合成。

植物细胞培养在放大过程中往往产量下降,次生代谢产物合成能力降低,其原因可能是细胞系的生产能力及稳定性的影响;剪切力的影响使细胞聚集体不能达到最佳分布范围,影响次生代谢产物的合成;反应器体系的气相成分与摇瓶不同,大容量反应器中过量通气导致有利于细胞生长和代谢的气体如二氧化碳、乙烯的丧失;另外,蛋白质及多糖物质的分泌产生大量泡沫,使细胞容易黏附成团聚集在液面、容器壁和搅拌轴上,从而影响物质的传递<sup>[4,29]</sup>。

在植物细胞培养中,许多因素都可能对细胞的生长及次生代谢产物产生影响,如培养基的pH值,培养温度,细胞生长周期及向培养基中添加抗褐化剂、目的化合物前体等都可能影响黄酮类化合物的合成<sup>[34,6,13]</sup>。因此,针对每一种植物需要通过系统实验探讨各因素与细胞生长及次生代谢产物合成之间的关系,以便找到最适培养条件。

### 6 小结与展望

在植物组织和细胞培养中黄酮的合成受多方面因素影响,没有标准的培养条件来适合不同植物的组织和细胞培养,因此不同植物的组织和细胞培养的最佳条件需要通过一系列实验进行探讨,得到合成最佳黄酮产量。

植物组织培养和细胞培养技术经过几十年的研究,已取得了很大的进展,有些药用植物种类已实现工业化生产,如从希腊毛地黄(*Digitalis lanata*)细胞培养物通过生物转化生产地高辛,从日本黄连(*Coptis japonica*)细胞培养中生产黄连碱等<sup>[30]</sup>。但是,植物细胞培养与组织培养中次生代谢物合成受多方面因素的影响,有许多影响因素的作用机制仍不清楚。目前,随着对黄酮生物合成途径及相关酶研究的日益深入,能够部分的通过改变生物合成途径或对相关酶活性进行调节来控制黄酮的生物合成。今后,在植物细胞培养方面有关次生代谢产物合成的影响因素研究中,应当结合现代生物技术,弄清各影响因素在分子或基因水平的作用机制,将对调节植物细胞合成目的化合物有着深远的意义。中草药是中华民族宝贵财富,许多珍稀濒危物种都有着难以替代的疗效。通过植物细胞培养和组织培养,寻找可以替代原药材的组织培养物或生物合成某些有效物质,在解决珍稀濒危药用植物的资源方面有着广阔的应用前景。

### REFERENCES

- [1] XING J M, ZHAO D X, LI M Y, et al. Advances in the production of flavonoids by plant cell cultures [J]. *Prog Biotechnol* (生物工程进展), 2001, 21(1):47-50.
- [2] LI M Y, ZHAO D X, XING J M, et al. Callus culture and flavonoids production of *Saussurea medusa* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2000, 22(1):65-70.
- [3] CHEN X S, DENG X X, ZHANG W C. Effects of medium and culture environment on flavonoid production of *Ginkgo biloba* Callus [J]. *Acta Horticult Sin* (园艺学报), 1997, 24(4):373-377.
- [4] LIU J J, GUO Y, ZHENG S P, et al. Research on the selecting suspension cell line of higher productivity of flavonol glycoside by hypoxia stress as well as the stability in subcultures [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2001, 17(1):94-97.
- [5] LI C B, WANG G L, YUE Y L, et al. Research on effect of culture condition factors on synthesis of flavone glycosides in cell suspension of *Ginkgo biloba* L [J]. *J Dalian Univ Technol* (大连理工大学学报), 2003, 43(3):287-291.
- [6] XING J M, ZHAO D X, LI M Y, et al. Cell growth and flavonoids production in suspension culture of *Saussurea medusa* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1998, 40(9):836-841.
- [7] SATO K, NAKAYAMA M, SHIGETA J. Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry [J]. *Plant Sci*, 1996, 113:91-98.
- [8] ZHONG J J, YOSHIDA T. High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: effects of sucrose concentration and inoculum size [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1995, 17:1073-1079.
- [9] XING J M, ZHAO D X, LI M Y, et al. Effect of carbon and nitrogen sources on cell growth and flavonoids production in suspension cultures

- of *Saussurea medusa* [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 1999, 15(2):230-234.
- [10] NAKAO M, ONO K, TAKIO S. The effect of calcium on flavanol production in cell suspension cultures of *Polygonum hydropiper* [J]. *Plant Cell Rep*, 1999, 18:759-763.
- [11] GAO L H, HU X W, LIU B, *et al.* Effects of calcium, phosphate, magnesium and potassium on suspension culture of *Saussurea medusa* [J]. *Lett Biotechnol* (生物技术通讯), 2003, 14(5):396-398.
- [12] JIANG L, ZHANG W C, KE Y. Effects of five macronutrients on cell growth and synthesis of flavonol glycosides of *Ginkgo callus in vitro* [J]. *Acta Horticult Sin* (园艺学报), 2000, 27(2):130-132.
- [13] ZHANG H, YU R M, YAO X S. Studies on the callus culture and the suspension culture of *Ginkgo biloba* and the formation of flavonoids [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1999, 16(2):129-133.
- [14] NAKAMURA M, SEKI M, FURUSAKI S. Enhanced anthocyanin methylation by growth limitation in strawberry suspension culture [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1998, 22:404-408.
- [15] PARMAR N, DADARWAL K R. Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoidlike compounds by rhizobacteria [J]. *J Appl Microbiol*, 1999, 86:36-44.
- [16] TUMOVA L, POUSTKOVA J, TUMA J.  $CoCl_2$  and  $NiCl_2$  elicitation and flavonoid production in *Ononis arvensis* L. culture *in vitro* [J]. *Acta Pharm*, 2001, 51:159-162.
- [17] YUAN X F, WANG Q, ZHAO B, *et al.* Improved cell growth and total flavonoids of *Saussurea medusa* on solid culture medium supplemented with rare earth elements [J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24:1889-1892.
- [18] ZHAO D X, FU C X, HAN Y S, *et al.* Effects of elicitation on jaceosidin and hispidulin production in cell suspension cultures of *Saussurea medusa* [J]. *Process Biochem*, 2005, 40:739-745.
- [19] MORI T, SAKURAI M. Effects of riboflavin and increased sucrose on anthocyanin production in suspended strawberry cell cultures [J]. *Plant Sci*, 1995, 110:147-153.
- [20] ZHAO D X, WANG Q, ZHAO J F. Effect of physical and chemical factors on callus growth and flavonoids biosynthesis in the callus cultures of *Saussurea medusa* [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 1998, 14(3):259-264.
- [21] DANIELL T, O' HAGAN D, EDWARDS R. Alfalfa cell cultures treated with a fungal elicitor accumulate flavone metabolites rather than isoflavones in the presence of the methylation inhibitor tubercidin [J]. *Phytochemistry*, 1997, 44(2):285-291.
- [22] PLATA N, KONCZAK-ISLAM I, JAYRAM S, *et al.* Effect of methyl jasmonate and p-coumaric acid on anthocyanin composition in a sweet potato cell suspension culture [J]. *Biochem Eng J*, 2003, 14:171-177.
- [23] CURTIN C, ZHANG W, FRANCO C. Manipulating anthocyanin composition in vitis vinifera suspension cultures by elicitation with jasmonic acid and light irradiation [J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25:1131-1135.
- [24] ZHAO D X, LI M Y, XING J M, *et al.* Effects of light on cell growth and flavonoids biosynthesis in callus cultures of *Saussurea medusa* Maxim [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 1999, 25(2):127-132.
- [25] KURATA H, MOCHIZUKI A, OKUDA N, *et al.* Intermittent light irradiation with second- or hour-scale periods controls anthocyanin production by strawberry cells [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2000, 26:621-629.
- [26] NAKAMURA M, TAKEUCHI Y, MIYANAGA K, *et al.* High anthocyanin accumulation in the dark by strawberry (*Fragaria ananassa*) callus [J]. *Biotechnol Lett*, 1999, 21:695-699.
- [27] ZHAO D X, HUANG Y, JIN Z, *et al.* Effect of aggregate size in cell cultures of *Saussurea medusa* on cell growth and jaceosidin production [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 21:1129-1133.
- [28] YUAN X F, ZHAO B, WANG Y C. Cell culture of *Saussurea medusa* in a periodically submerged air-lift bioreactor [J]. *Biochem Eng J*, 2004, 21:235-239.
- [29] HUANG Y, ZHAO D X, LV D P, *et al.* Studies on the cell suspension culture of *Saussurea medusa* in a stirred tank bioreactor [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2001, 17(5):561-565.
- [30] CHENG J, GUO Y. Research progress in the production of plant cell-derived drugs [J]. *Jiangxi Sci* (江西科学), 2000, 18(1):60-62.

(收稿日期:2005-05-10)

## 全国医院药房建设与管理学术研讨会征文通知

随着我国经济建设的高速发展,医疗卫生领域的改革不断深化,医院药学工作也经历着深刻的变革。医院药学工作者在药房建设和规范化管理方面不断探索,积累了一些宝贵经验和新的工作模式与流程,也面临着许多亟待解决的问题。为此,中国药学会医院药学专业委员会拟于2006年9月下旬在北京召开“全国医院药房建设与管理学术研讨会”,分享成果与经验,研讨存在的问题,共同推动我国医院药学事业的发展。会议由《中国药学杂志》编辑部和北京大学第三医院承办。欢迎大家踊跃投稿。

**1 征文范围** ①如何完善和落实医院药学专业委员会编写的《优良药房工作规范(2005版)》;②门诊药房、急诊药房和住院药房建设模式和布局的探索和研究;③门诊及住院药房患者的用药服务和用药管理;④门诊及住院药房服务的流程创新和服务创新;⑤门诊及住院药房调剂自动化的实践和管理经验;⑥怎样利用现代管理的观念和手段加强医院药房的人力资源管理;⑦药房药品管理的新技术、新措施和新经验;⑧医院药学人员的继续教育和知识结构更新。

**2 征文要求** ①论文未在公开发行人期刊或全国性学术会议上发表或交流过,文责自负;②论著不超过3500字,综述不超过5000字,并附300字以内的结构式摘要;③稿件要求宋体,4号字,1.5倍行距。稿件格式按《中国药学杂志》2006年第一期稿约;④请用E-mail传递或邮寄文稿。邮寄稿件应一式两份并附软盘;⑤要求字迹清楚,数据准确;投稿截止日期2006年8月10日(以邮戳为准)。

**3 会议地点和时间** 具体地点和时间见第二轮通知。也可登陆中国药学会网站([www.cpa.org.cn](http://www.cpa.org.cn))或中国药学会医院药学专业委员会([www.cpahp.org.cn](http://www.cpahp.org.cn))查询本次会议通知。

**4 联系人及联系电话** 联系人:周颖玉、张传林、宋彦平, E-mail: zhengwen@wx9999.com; 电话:(010)68361318, 68361320; 传真:(010)68361390; 地址:北京市西城区北礼士路甲38号(100810) 中国药学杂志市场部。

[本刊讯]