

高文远 贾伟 主编

肖培根 主审

药用植物 大规模组织培养



Chemical Industry Press



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

药用植物大规模组织培养

高文远 贾 伟 主编
肖培根 主审



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

药用植物大规模组织培养/高文远, 贾伟主编. —北京:
化学工业出版社, 2005. 2
ISBN 7-5025-6665-1

I. 药… II. ①高…②贾… III. 药用植物-组织培养
IV. S567.035.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 011173 号

药用植物大规模组织培养

高文远 贾 伟 主编

肖培根 主审

责任编辑: 杜进祥

文字编辑: 焦欣渝

责任校对: 顾淑云 李 军

封面设计: 关 飞

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行

现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印装

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 23¼ 字数 435 千字

2005 年 4 月第 1 版 2005 年 4 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-6665-1/Q·136

定 价: 48.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

《药用植物大规模组织培养》编委会

主 审 肖培根

主 编 高文远 贾 伟

副主编 黄璐琦 邱德有

编 委 (按拼音排序)

陈海霞 陈美兰 陈士林 陈 巍

段宏泉 高文远 郭肖红 黄璐琦

贾 伟 刘明言 马小军 邱德有

宋经元 张铁军 周 杰

序

中药现代化需要各种先进技术的应用，蓬勃发展的生物技术使中药现代化的发展如虎添翼，并由此产生了一个新的学科——中药生物工程学。作为中药生物工程的核心内容之一，药用植物组织培养技术，在药用植物的资源保护和可持续利用方面可以发挥重要的作用。

药用植物组织培养技术的应用，可以体现在如下几个方面：通过细胞培养直接生产活性化合物或活性有效部位；培养药用植物的器官或再生器官，部分替代野生或大田栽培的药用植物资源；与大田栽培相结合，快速大量繁殖药用植物的种苗；作为一个载体，进行药用植物的转基因组织和器官培养以及遗传育种研究；作为一种手段，深入研究药用植物的次生代谢机理；通过饲喂前提物质，利用药用植物的培养物进行生物转化，可以产生目的化合物或者有特色的培养物；采用药用植物的组织或器官培养物直接开发有特色的药物或功能食品等。

与大田栽培相比，植物组织培养技术具有许多优点，如培养不受地理环境因素的限制；可以提供一个 GMP 式的标准化生产过程，生产连续、产品质量稳定可控；生产周期短、速度快；产品无农药残留物的污染；可以有目标地生产目的化合物等。因此，自 1902 年 Haberlandt 首次尝试培养分离的植物细胞至今，国际上植物组织培养的研究发展很快，许多技术已经开始应用在农作物和经济作物上，如马铃薯脱毒苗的生产，香蕉、甘蔗和许多花卉的种苗的大量快速生产，以及紫草的工业化培养获取紫草素等。这些技术在药用植物上的成功应用，将对解决我国日益严重的中药资源问题，具有十分重要的意义。

日本早在 20 世纪 80 年代初，就成功地进行了人参细胞培养的工业化生产，采用的反应器规模达到了 20t。90 年代末，韩国成功地进行了高丽参不定根的工业化培养，反应器的规模达到了 10t，并用培养的高丽参不定根开发了系列保健品和化妆品。我国药用植物的组织培养研究曾经大起大落，但近些年来发展很快，组织培养技术开始成功地应用在石斛、降香的种苗生产以及雪莲细胞的大规模悬浮培养等方面。另外，以人参组织培养物为原料开发的化妆品在市场上也很畅销。

我国是世界上使用和出口药用植物资源最多的国家，许多名贵中药的野生资源已经罕见，如冬虫夏草、野山参等；另外，一些大宗药材的栽培品种难以替代

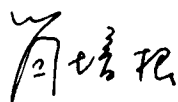
野生资源，如甘草，导致野生资源的不断被采挖，造成了严重的生态问题；此外，一些重要药用植物的栽培存在着许多问题，如人参、西洋参、三七等的栽培需要砍伐大量的山林、破坏生物多样性、有农药和重金属残留等。因此，药用植物组织培养技术的应用对我国有着更为特殊的意义。深入研究发展该项技术，部分解决日益严重的中药资源问题，是一项伟大的事业。

药用植物组织培养的应用，离不开其工业化过程，反应器的研制与应用是关键的一步。本书的内容定位在药用植物“大规模”培养的基点上，对反应器的应用作了专门的阐述，对从事中药生物工程事业的人员有一定的参考价值。

本书主编高文远博士留学韩国和香港，承担和参与了高丽参的细胞、不定根、毛状根工业化培养等多项中药生物工程项目。编写组人员集中了一批年轻有为的科研工作者，他们中有的从事中药生物工程研究，有的从事生药学研究，有的从事反应器的研究，有的从事中药有效成分的研究。我相信这本集多学科年轻学者的智慧结晶，将为我国中药生物工程学科的发展起到很好的推动作用，鉴于此，欣然为之序。

中国工程院 院士

中国医学科学院药用植物研究所 名誉所长

 教授

2005 年 1 月

前 言

药用植物的大规模组织培养对我国具有非常重要的意义,因为我国是世界上使用和出口药用植物最多的国家,大规模组织培养技术可以为部分解决我国中药的资源替代问题提供一条有效的途径。药用植物的组织培养,一方面可以直接生产次生代谢物,如紫草素、紫杉醇、长春新碱的生产等;另一方面可以生产替代资源,如用组织培养生产的高丽参不定根已经开发成功了一系列功能食品和化妆品,利用虫草的菌丝发酵物已经生产了大量的保健品等。此外,还可以与 GAP 栽培相结合,如石斛、降香、太子参、金线莲等,组织培养技术已经是这些药用植物 GAP 栽培不可缺少的技术环节。因此,本书的出版既有重要的理论意义,又有重要的实用价值。

从现有的组织培养方面的图书来看,大规模培养的内容很少,本书的出版,将弥补此方面的空白。本书编写时在内容和格式上均不同于以往的相关图书,突出了大规模培养的特点。在理论上力求反应本领域的国际前言,引用了大量的国内外资料;在内容上既有药用植物组织培养的内容,还有反应器的设计与使用以及针对组织培养物进行分析的内容。在组织培养的内容中既叙述了次生代谢调控的基础理论,又介绍了大规模工业化培养的具体实例;在详细介绍了药用植物细胞培养的同时,又突出了药用植物器官培养的优势;既有药用植物普通细胞和器官的培养,又有转基因组织和器官的培养。内容丰富详实,新颖全面。本书的读者对象可以是院校和科研院所的工作人员,也可以是相关企业和 GAP 基地的工作人员;本书既适合于从事中药和药用植物的专业人员,也适合于从事生物学、植物学和天然产物专业的工作人员。

在本书的编写过程中,各位编委努力工作,精诚合作。第一章和第八章由高文远和贾伟共同完成;第二章由邱德有完成;第三章和第五章由黄璐琦、陈美兰、陈巍共同完成;第四章由刘明言、周杰共同完成;第六章由郭肖红、陈巍、陈海霞共同完成;第七章由宋经元、陈士林和马小军共同完成;第九章由段宏泉、张铁军共同完成;附录由郭肖红完成。

本书的编写过程中,引用了大量国内外公开发表的学术论文,在此对这些原文作者致以诚挚的谢意。感谢恩师肖培根院士多年的鼓励和培养,并在百忙中为本书作序;感谢博士后导师韩国忠北大学的 KEE-YOEUP PAEK 教授和香港生

物技术研究院的藤惠兰博士，他们提供了让我从事药用植物大规模培养的机会。

由于时间仓促及水平有限，书中一定有许多不尽如人意的地方，虚心接受读者的批评和指正，使本书再版时可以进一步完善和提高。

高文远

2005 年元月

目 录

第一章 概论	1
第一节 药用植物对人类的贡献	1
第二节 生物技术应用的意义	3
第三节 植物细胞培养生产药用次生代谢产物	4
第四节 促进药用植物细胞培养生产次生代谢产物的措施和技术	8
一、筛选高含量的细胞系	8
二、用培养液的调整来促进目的产物的合成	9
三、优化培养环境和培养条件	11
四、诱导子的作用 (elicitation)	12
五、渗透处理	13
六、产品的原地转移	13
七、 β -环糊精的应用	14
第五节 植物器官培养生产药用次生代谢产物	14
第六节 毛状根培养生产药用次生代谢产物	15
第七节 药用植物固定化细胞培养生产次生代谢产物	17
第八节 生物转化法用于次生代谢物的生产	19
第九节 药用植物细胞的大规模培养	21
第十节 我国药用植物组织培养的发展与策略	22
一、我国药用植物组织培养的发展	22
二、我国药用植物组织培养的策略分析	23
主要参考文献	27
第二章 药用植物克隆培养中活性成分合成及其调控	31
第一节 国内外现状, 意义	31
一、国内外现状	31
二、研究意义	32
第二节 基本理论和基本方法	33
一、药用植物克隆培养中活性成分生物合成途径的研究	33
二、参与生物合成相关酶的提取分离、纯化及性质分析	35

三、生物合成相关基因的克隆、分离及表达特性的研究	35
四、生物合成调控的研究	43
第三节 活性成分代谢与调控研究的实例	47
第四节 活性成分合成与调控研究的热点领域	56
一、活性成分的贮存	56
二、活性成分的运输	57
三、活性成分的降解	58
第五节 存在问题及展望	58
主要参考文献	59
第三章 药用植物组织培养的基本方法	63
第一节 药用植物组织培养的基本设备及技术	63
一、基本设备	63
二、基本操作技术	69
第二节 药用植物组织培养的技术与方法	82
一、药用植物组织培养的基本技术和方法	82
二、外植体的接种	91
三、影响药用植物组织培养的因素	91
四、增加药用植物组织培养物中活性成分的方法	93
主要参考文献	96
第四章 反应器在药用植物大规模培养中的应用	98
第一节 反应器应用的必要性	99
第二节 反应器的理论基础	100
一、反应器的分类	100
二、反应器的体积	101
三、植物细胞、组织或器官培养用反应器	106
四、培养介质的流变学特性	108
五、反应器内的多相流动形态及培养液性质	109
六、反应器内的质量传递	110
七、反应器内的热量传递	113
八、反应器内存在的剪切应力问题	114
九、反应器流动模型	117
十、反应器的放大	120
十一、过程参数检测与控制	126
第三节 反应器的种类及选择	130
一、植物细胞培养的特点	130

二、反应器的设计基本要求	130
三、用于植物细胞培养的反应器	131
四、各类反应器	131
五、反应器的比较与选择	144
六、植物组织培养及反应器	145
七、反应器的放大	145
主要参考文献	146
第五章 药用植物的细胞培养及工业化生产	147
第一节 药用植物的细胞培养	147
一、单细胞的分离	148
二、单细胞培养的方法	149
三、单细胞的培养条件	150
四、高产细胞系的诱导和筛选	151
第二节 药用植物愈伤组织的诱导与培养	152
一、愈伤组织的诱导以及影响因素	153
二、愈伤组织的生长	155
三、愈伤组织发生的形态学和细胞学	156
第三节 细胞悬浮培养	157
一、培养系统	157
二、悬浮细胞培养周期	159
三、细胞培养的基本程序	159
四、培养设备和装置	160
五、悬浮培养细胞的同步化	162
六、悬浮细胞培养中细胞生长的计算	163
七、影响细胞分散度的因素以及提高细胞分散度的方法	164
八、影响悬浮细胞培养的因素	165
第四节 药用植物细胞培养的工业化生产	167
一、人参细胞悬浮培养及工业化生产人参皂苷	168
二、紫草的细胞培养与工厂化生产紫草素	172
主要参考文献	174
第六章 药用植物的组织和器官培养	176
第一节 药用植物组织和器官培养的意义	176
第二节 药用植物的快速繁殖	176
第三节 药用植物的愈伤组织培养和植物再生	181
第四节 药用植物的体细胞胚胎发生和植株再生	185

第五节 药用植物的原生质体培养·····	189
第六节 药用植物的花药培养·····	195
第七节 药用植物的人工种子·····	197
主要参考文献·····	199
第七章 药用植物转基因组织和器官培养·····	203
第一节 药用植物转基因组织和器官培养的研究进展与发展前景·····	203
一、研究历史、存在的问题、发展前景·····	203
二、转化机理与培养特点·····	204
三、转基因组织和器官培养的应用·····	205
四、转基因组织和器官的生长与活性成分积累的调控·····	211
第二节 药用植物转基因组织和器官培养的主要技术环节·····	213
一、农杆菌菌种的保存与培养（包括菌种所含质粒的改造）·····	213
二、药用植物无菌培养体系的建立·····	214
三、转化〔菌种的活化、外植体的选择、接菌方式（共培养、针刺、 负压等）〕·····	214
四、除菌及筛选·····	215
五、转化的证实·····	215
六、转基因组织和器官培养体系的建立·····	215
七、转基因组织和器官的生长与活性成分积累的调控技术·····	216
八、摇瓶培养与反应器培养技术·····	216
第三节 药用植物转基因组织和器官培养的实例·····	217
一、毛状根培养的实例（紫草）·····	217
二、冠瘿组织培养的实例（丹参）·····	222
三、毛状根与冠瘿组织共培养的实例（ <i>Duboisia</i> 杂交种与颠茄）·····	229
四、双转化毛状根培养的实例（桔梗）·····	233
五、绿色毛状根培养的实例（长春花）·····	235
第四节 转基因药用植物生产疫苗等生物活性成分与基因工程育种·····	238
一、转基因药用植物生产抗体和疫苗·····	238
二、基因工程育种及安全性评价·····	246
主要参考文献·····	251
第八章 人参不定根和毛状根的培养·····	256
第一节 人参属药用植物组织和细胞培养的研究进展·····	256
一、愈伤组织的诱导与培养·····	256
二、试管苗的再生·····	257
三、细胞悬浮培养·····	258

四、反应器培养	260
五、毛状根和冠瘿瘤的培养	260
第二节 人参不定根和毛状根培养的材料与方法	262
一、植物材料	262
二、愈伤组织的诱导和增殖	262
三、不定根的诱导和增殖	263
四、毛状根的诱导、鉴别和增殖	263
五、不定根和毛状根的摇瓶培养	264
六、不定根和毛状根的生物反应器培养	264
七、培养基中无机成分的分析	264
八、培养基成分对于不定根和毛状根生长和皂苷含量影响的研究	264
九、物理环境对不定根和毛状根生长以及皂苷生产的影响	267
十、根重量的测定	267
十一、皂苷含量的测定	267
十二、人参多糖的测定	268
十三、可溶性糖和总糖含量的测定	268
第三节 人参不定根培养的实验结果	269
一、愈伤组织和不定根的诱导与增殖	269
二、摇瓶培养中培养基盐浓度对不定根生长和皂苷形成的影响	269
三、植物生长调节剂对不定根生长和皂苷形成的影响	270
四、生物反应器实验中补充培养基对不定根培养的影响	270
五、摇瓶培养时大量元素和金属元素对于不定根生长和皂苷形成的影响	271
六、摇瓶和反应器中 N 源对于不定根生长和皂苷合成的影响	271
七、摇瓶培养中碳源和渗透剂对不定根生长和皂苷合成的影响	272
八、生物反应器类型对不定根生长和皂苷合成的影响	273
九、摇瓶和生物反应器两步培养时诱导剂对不定根生长和皂苷合成的影响	273
十、碳、氮和磷饥饿在两步培养系统中对不定根生长和皂苷合成的影响	274
十一、白天和黑夜不同温度 (DIF) 的变化对人参不定根生长和皂苷合成的影响	275
第四节 人参毛状根培养的实验结果	275
一、摇瓶培养时毛状根生长和皂苷合成的特点	275
二、毛状根培养时培养基成分的变化	275

三、摇瓶培养时培养基的盐浓度对毛状根生长和皂苷合成的影响·····	276
四、反应器培养时植物生长调节剂对毛状根生长和皂苷合成的影响·····	276
五、摇瓶和生物反应器培养时碳源对毛状根生长和皂苷合成的影响·····	277
六、摇瓶培养时渗透压对毛状根生长和皂苷合成的影响·····	277
七、摇瓶和生物反应器培养时诱导剂对毛状根生长和皂苷合成的影响·····	277
八、摇瓶培养时培养基 pH 值对毛状根生长和皂苷合成的影响·····	278
九、白天和黑夜不同温度 (DIF) 的变化对毛状根生长和皂苷合成的影响·····	278
十、反应器培养时光照对毛状根生长和皂苷合成的影响·····	279
主要参考文献·····	279
第九章 药用植物组织培养物的色谱分析·····	282
第一节 薄层扫描法·····	283
一、薄层色谱的固定相·····	284
二、展开剂·····	285
三、薄层扫描法及其仪器·····	286
四、薄层扫描定量方法·····	287
五、分析实例——小蔓长春花组织培养物中长春胺的含量测定·····	288
第二节 气相色谱与气相-质谱联用技术·····	289
一、天然产物分析常用的气相色谱·····	289
二、仪器的基本组成·····	290
三、色谱柱的类型和选择·····	290
四、常用检测器·····	291
五、气相-质谱联用·····	292
六、在中药和天然产物挥发油分析上的应用·····	294
第三节 高效液相色谱法·····	294
一、HPLC 的关键部分——色谱柱·····	295
二、检测器·····	297
三、分析实例·····	301
第四节 高效毛细管电泳法·····	303
一、HPCE 的基本原理·····	303
二、毛细管区带电泳 (CZE)·····	303
三、胶束电动毛细管色谱 (MECC)·····	304
四、天然有效成分的分析应用·····	304
五、毛细管柱·····	305

六、检测方法..... 306

第五节 样品前处理..... 306

一、前处理方法的选择..... 307

二、样品前处理技术..... 308

主要参考文献..... 311

附录 国内外部分常用药用植物组织培养方法..... 312

主要参考文献..... 338

第一章 概 论

第一节 药用植物对人类的贡献

多少年来,自然界中的植物为人类提供了大量的食物,包括碳水化合物、蛋白质和脂肪油等。同时,植物还提供了大量的次生代谢产物,用于药品、健康产品、色素、香料、化妆品、食品添加剂、生物农药和杀虫剂等。现有的约 30000 种已知的天然产物中 80% 均来自植物。植物天然产物的数量大约是微生物天然产物的 4 倍。截止到 1985 年,约有 3500 种新的化合物结构被鉴定,其中 2600 种来自高等植物。在全世界范围内,至少有 121 种临床药物来自药用植物。美国的调查显示,1991~1998 年,使用植物药物的人群数量从 3% 增至 37%。美国市场上每年植物药的销售额达 30 亿美元。在美国,尽管化学合成药物占据着主导地位,但有 25% 的药物来源于植物提取的化合物。人们有理由相信,植物将继续提供新的产品和新的先导化合物用于新药的研制,因为仍有大量的植物化合物的新结构等待人们去鉴定。化学分析手段的不断进步和化学分类学知识的应用将帮助人类进一步快速地提取分离鉴定新的化合物,并在严格可控的条件下筛选这些化合物的活性,从而发现新的药物和功能产品。植物来源的化合物结构的复杂性导致其极难被合成。因此,不管化学合成的手段多么先进,仍不能取代生物资源作为次生代谢物的源泉以从中开发药物和功能食品等。表 1-1 列出了一些植物来源的重要药物。

植物光合作用的结果合成了初级代谢产物,又通过精巧而复杂的次生代谢途径产生许多次生代谢产物。这些次生代谢产物中,许多是植物所特有的,动物和微生物不能产生。另外,随着转基因技术的发展,植物还可以合成一些原本自身不能合成的分子和化合物。植物通过各种途径产生的分子和化合物,为人类提供了丰富的药物资源。

目前,世界上仍有 75% 的人口使用以植物为主要药物的传统医学治疗疾病。我国是世界上使用药用植物资源最多的国家。在我国现有的 12807 种中药材中,药用植物达 11146 种,占 87%。几千年来,药用植物对中华民族的健康事业作出了巨大贡献。

表 1-1 植物来源的重要药物

产 品	用 途	植 物 名 称	价格/(美元/kg)
ajmalicine(阿吗碱)	抗高血压	<i>Catharanthus roseus</i> (长春花)	37000
artemisinin(青蒿素)	抗疟	<i>Artemisia annua</i> (青蒿)	400
ajmaline(阿吗灵)	—	<i>Rauvolfia serpentina</i> (蛇根木)	75000
acinitine	—	<i>Acotinum</i> spp.	不可用
berberine(黄连素)	肠疾	<i>Calystegia japonica</i> (长裂旋花)	3250
camptothecin(喜树碱)	抗肿瘤	<i>Camptotheca acuminata</i> (喜树)	432000
capsaicin(辣椒素)	反刺激剂	<i>Capsicum frutescens</i> (小米椒)	750+
castanospermine(栗精胺)	糖抑制剂	<i>Castanospermum australe</i>	不可用
codeine(可待因)	镇静剂	<i>Papaver somniferum</i> (罂粟)	17000
colchicine(秋水仙碱)	抗肿瘤	<i>Colchium autumnale</i> (秋水仙)	35000
digoxin(地高辛)	心脏刺激剂	<i>Digitalis lanata</i> (毛花洋地黄)	3000
diosgenin(薯蓣皂苷配基)	Steroidal precursor	<i>Dioscorea deltoidea</i> (三角叶薯蓣)	1000
ellipticine(毛鱼藤素)	抗肿瘤	<i>Orchrosia elliptica</i>	240000
emetine(吐根碱)	—	<i>Cephaelis ipecacuanha</i> (吐根)	1500
forskolin(毛喉菇)	支气管哮喘	<i>Coleus forskohlii</i> (毛喉鞘蕊花)	不可用
ginsenoside(人参皂苷)	滋补品	<i>Panax ginseng</i> (人参)	不可用
morphine(吗啡)	镇静剂	<i>Papaver somniferum</i> (罂粟)	340000
podophyllotoxin(鬼臼毒素)	抗肿瘤	<i>Podophyllum petalum</i> (足叶草)	不可用
quinine(奎宁)	抗疟	<i>Cinchona ledgeriana</i> (金鸡纳)	500
sanguinarine(血根碱)	抗癌疫	<i>Sanguinaria canadensis</i> (美洲血根草)	4800
shikonin(紫草素)	抗菌	<i>P. somniferum</i> (罂粟)	
taxol(紫杉醇)	抗癌	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> (紫草)	4500
vincristine(长春新碱)	抗白血病	<i>Taxus brevifolia</i> (短叶红豆杉)	600000
vinblastine(长春碱)	抗白血病	<i>Catharanthus roseus</i> (长春花)	2000000
		<i>Catharanthus roseus</i> (长春花)	1000000

随着中药现代化的发展,对药用植物资源的用量会不断增加。除野生采集外,药用植物的大田栽培是目前提供中药材的主要途径。但我国是世界上人均可耕地面积最少的国家之一,有限的可耕地资源用于种粮食尚且不足,还要用大量的土地种植药用植物,这必然会出现中药材栽培与农作物栽培争地的矛盾。对于人参、西洋参等药用植物来说,由于“老参地”问题不能解决,导致每年大量的山林被砍,造成水土和生物的大量流失。同时,药用植物的大田栽培往往使用大量的农药,造成严重的农药残留和重金属残留问题。药用植物大规模组织培养是解决这些问题的有效途径。而且,药用植物的组织培养与大田栽培相比有许多优点,如药材的生产条件可控、可进行生物转化生产目标成分等。本章将结合药用植物组织培养的国际和国内发展状况,探讨其在我国中药现代化上应用的思路与方法。