文章编号：1000-5773(2006)02-0183-06

高压处理种子对提高长春花中长春碱含量的作用*

陈丽英[1,2]，吴学华[1]，刘秀茹[1]，苏 磊[1]
洪时明[1]，梁恒兴[3]，郭 力[3]

(1. 西南交通大学理学院高压物理研究所，四川成都 610031；
2. 武汉理工大学理学院，湖北武汉 430070；
3. 成都中医药大学药学院，四川成都 610075)

摘要：在室温下对干燥的一年生矮种长春花种子进行了静高压氮气处理，压力分别为 10、20、30 MPa，保压 4 h。将各处理组与未经高压处理的对照组种子同时在相同的自然条件下进行播种培育。详细观察对比了各组植株的花形等性状，用高效液相色谱检测了生长旺盛期植株中长春碱和长春新碱的含量，另外还观察了剪枝后再生植株的生长性状。结果表明：种子经高压处理的各组长春花植株中的长春碱含量都有显著增加；长春新碱含量也有提高趋势。这种变化与花形改变和再生植株患病率的分布有一定程度的对应关系。初步认为植株体内长春碱含量的提高可能与高压导致的愈伤组织有关。

关键词：长春花；高压；长春碱；长春新碱
中图分类号：O521.9 **文献标识码**：A

1 引 言

长春花(*Catharanthus roseus*)为夹竹桃科、长春花属，多年生草本植物。它是一种具有较高药用价值的中药材。从长春花植株中可以提取近百种生物碱，其中以长春碱(*Vinblastine*)、长春新碱(*Vincristine*)最有实用价值，它们对多种癌症都有显著的疗效。但这两种成份在长春花体内的含量很低，分别为十万分之几和百万分之几。因此，研究如何提高长春花植物体内长春碱、长春新碱的含量，对抗癌药物的进一步开发具有十分重要的科学意义和应用价值。

过去关于长春花中生物碱的研究主要集中在长春花组织和细胞培养技术方面[1-2]。张玲琪等人通过对长春花内生真菌的分析，初步认为培养真菌的方法可以产生长春新碱成分[3]。在长春花细胞培养中，一直未能检测到双吲哚生物碱长春碱[4]。除细胞培养技术外，1988 年 Parr 等人通过诱导长春花形成毛状根的方法，从毛状根中检测到被认为是次生代谢产物的长春碱[4]。但能否用这种方法提高长春花植株中长春碱的相对含量尚没有进一步报道。

过去关于提高长春花植株中生物碱含量的研究基本上都属于生物学与生物化学的范畴。近年来，高压育种、航天育种、辐射育种等物理方法已在植物学领域得到研究和应用。徐世平、白成科等人研究了静水高压处理萌动水稻种子对水稻生长发育的影响，发现高压不仅对水稻的生长发育有影响，而且能诱导水稻产生变异[5-6]。这些研究都说明高压处理种子可能成为一种改良植物品种的有效方法。

本工作采用氮气作为传压介质对长春花种子进行了静高压处理，观察了长春花生长性状，检测了实验植株中长春碱和长春新碱含量。旨在探索一种提高长春花植株中有效药物成分含量的方法。

* **收稿日期**：2005-01-27；**修回日期**：2005-11-28
作者简介：陈丽英(1974—)，女，硕士.

2 材料与实验方法

2.1 种子及其处理

实验采用美国 W. Atlee Burpee 公司出售的一年生矮种长春花种子(*Catharanthus roseus*),对种子进行了两季常规栽培,植株性状稳定。在以氮气为传压介质的高压装置上分别对随机分组的种子进行了三种不同条件的静高压处理。压力分别为 10、20、30 MPa,温度均为 15 ℃,保压时间为 4 h。高压装置的示意图见图 1。

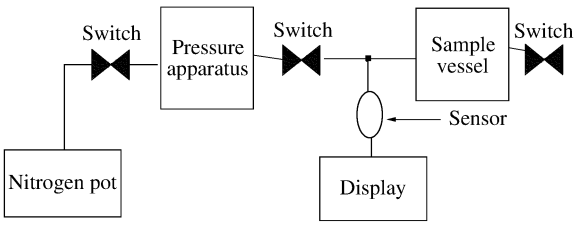


图 1 高压处理装置

Fig. 1 Pressure treatment apparatus

2.2 栽培管理与性状观测

将不同压力处理过的三组种子与未经高压处理的对照组种子同时在相同自然条件下播种,每组 50 粒。发芽后经一次分栽,至真叶 4～5 枚后,每组分别随机选取 15 株移栽至实验盆,将实验盆置于自然环境相同且阳光充足的平台上。幼苗期进行 2 次摘心。播种后第 142 d,将各组植株从根部剪枝。

自播种第一天起,每天记录天气、温度、湿度等参数。同时,对植株的生长性状进行观察,并进行常规水肥管理和病虫害防治。

为了全面分析压力对植株生长性状的影响及其原因,对剪枝后植株的情况也作了详细观察和记录。剪枝后,根部长出再生植株。播种后第 227 d,室外温度降至 15 ℃以下。再生植株被移至 16～23 ℃、平均湿度为 85%的温室。观察记录一直持续到播种后第 250 d。

实验地点在四川成都地区。气温为 15～35 ℃,平均湿度为 85%。

2.3 分析检测

播种后第 142 d,各组长春花均处于生长旺盛时期。将各组植株从根部剪下,让其自然风干 15 d 后,将植株干草研磨成粉。

精密称取标准样品长春碱和长春新碱各 10 mg(购自海南长春花开发有限公司,企业标准为 94%/CP2000/BP98/USP24),加流动相:水、甲醇、二乙胺(300∶700∶5),定容为 25 mL,得标准样品溶液;精密称取每组药材粗粉各 15 g,用 0.7%硫酸溶液煎煮两次,每次 200 mL,过滤。合并滤液,再将滤液浓缩至 50 mL。用石油醚萃取 3 次,用量分别为 50、50、40 mL。分液,水层用氨水调至 pH 值在 8～9 之间。再用氯仿萃取 3 次,用量分别为 50、50、40 mL。分液,合并氯仿液,减压回收溶剂,残渣用甲醇定容为 25 mL,得各组样品溶液。

取标准样品溶液和各组样品溶液各 20 μL,使用 HP1100 高效液相色谱仪(G1310AIsoPump;G1313A ALS;G1316A colcom;G1314A VMD 检测器;Chemstation 数据处理软件)分析长春花干草中长春碱和长春新碱含量。

3 实验结果与分析

3.1 对长春花生长性状的观察

播种 80 d 后各组植株开始开花,播种 137 d 后开花数出现明显减少趋势。各组平均每株开花数随压力的增加略有减少(如图 2)。在这段开花期内,对照组开花的花形如图 3(a)所示。而各加压组中不同程度地出现了花形变化:花瓣变窄,甚至变成月

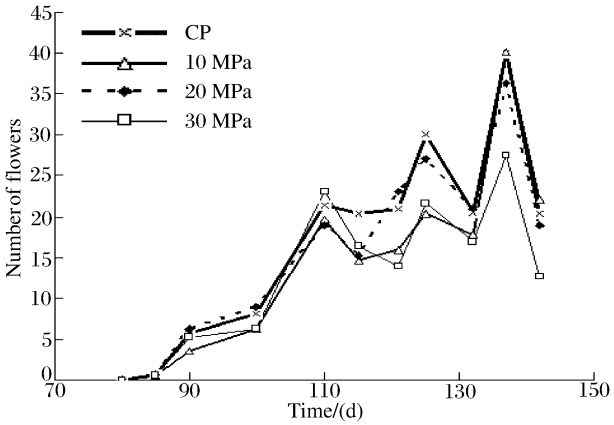


图 2 各组平均单株开花数变化曲线

Fig. 2 Graphs of average number of flowers in each plant of respective group

芽形,如图 3(b)。值得注意的是:加压各组花形改变的概率高达 50%～70%,这种改变在对照组出现的概率则为零。各组植株花形改变具体分布情况见表 1。



(a) Flower shape in the CP group



(b) Abnormal flower shape in the pressure treated groups

图 3　两种典型的花形

Fig. 3　Two typical shapes of the flowers

表 1　不同压力下各组植株花形改变率与再生植株中病株比例

Table 1　Ratio of changed floral shape and ill aftergrowth plants in each group

Ratio	CP	p/(MPa)		
		10	20	30
Ratio of changed floral shape/(%)	0	70	50	70
Ratio of ill aftergrowth plants/(%)	0	70	37	60

Note:CP—The comparison group.

另一方面,对剪枝后的再生植株的观察表明:各加压组再生植株在移入温室后生长速度很慢,绝大部分植株出现叶片缩小,色泽灰暗,叶表面凹凸不平,节间缩短等现象(如图 4)。我们认为,这些现象符合长春花病毒病的症状[7]。与此不同,对照组的再生植株则完全没有发现这种现象。对照组再生植株移入温室后继续生长,叶片丰厚,色泽鲜艳(如图 5)。我们还注意到:各加压组再生植株出现病株的比例很高,并且,其病株比例与 142 d 前花形改变比例有一定对应关系(见表 1)。但剪枝前各加压组患病特征并不明显。

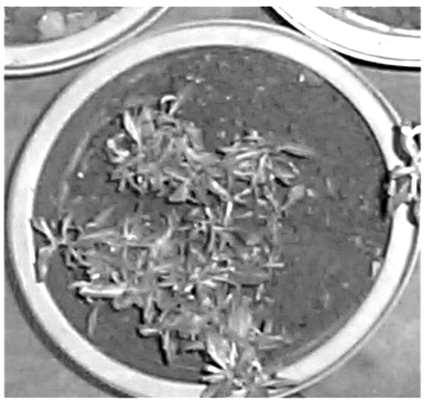


图 4　长春花患病植株(选自加压组再生植株)

Fig. 4　Typical ill plant of *Catharanthus roseus* (Aftergrowth of the pressure treated groups)

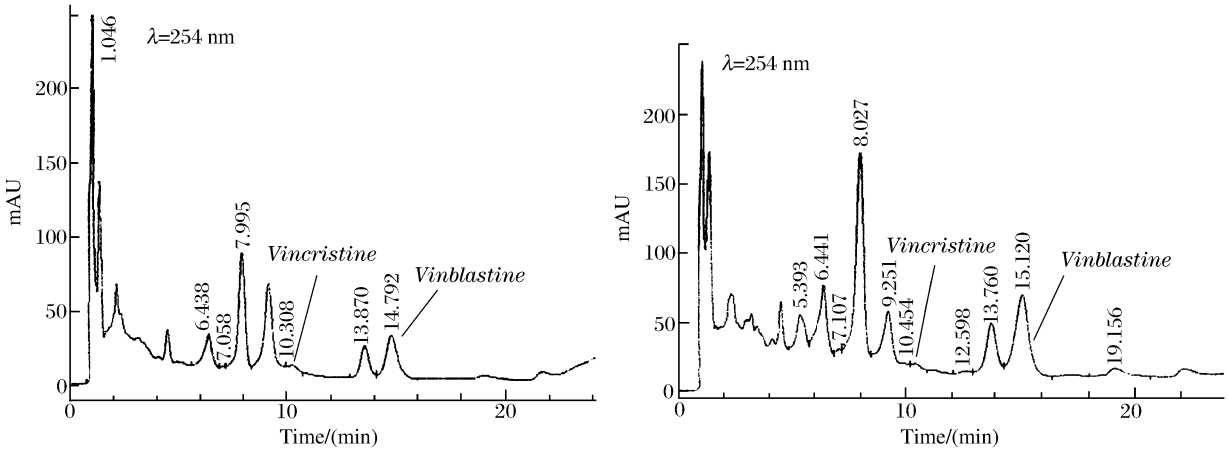


图 5　长春花正常植株(选自对照组再生植株)

Fig. 5　The natural plant of *Catharanthus roseus* (Aftergrowth of the CP group)

3.2 高压处理种子对长春花植株体内长春碱、长春新碱含量的影响

色谱检测结果表明:与对照组相比,各加压组植株中长春碱的含量均有明显提高。其中,10 MPa 组中植株体内长春碱的含量提高到对照组的 2.3 倍;20 MPa 组提高到 1.90 倍;30 MPa 组提高到 2.55 倍。重复进样 5 次,误差在 1.6%以内。长春新碱含量也有提高趋势。图 6 给出了长春花植株色谱检测图例。长春碱、长春新碱含量检测结果见表 2。



(a) The CP group (b) Pressure treated group(10 MPa)

图 6 长春花植株色谱检测图

Fig. 6 Chromatograms of the *Catharanthus roseus* plants

表 2 不同压力下各组植株干草中长春碱、长春新碱的含量(HPLC 分析结果)

Table 2 Contents of *Vinblastine* and *Vincristine* of dry plants in each group (by HPLC)

Composition	CP	*p*/(MPa)		
		10	20	30
Vinblastine/(mg/g)	0.101 8	0.237 2	0.193 0	0.255 1
Vincristine/(mg/g)	0.003 9	0.003 1	0.004 9	0.005 7

Note: CP—The comparison group.

4 讨 论

Saltvait 等曾报道经高压处理的植物组织细胞膜的结构发生了改变,从而伤害到细胞膜的功能[8]。李桂双、白成科等也曾报道静水高压处理后的水稻生长明显受到抑制[9]。本实验中经静高压处理的长春花植株花形改变,开花数目略有减少,剪枝后再生植株容易感染病毒,移至温室后再生植株生长速度慢。这些生长性状的变化也可以认为是由于高压破坏了长春花种子的细胞膜结构,使其植株的某些器官容易形成愈伤组织,生长发育受到抑制的缘故。

许多研究表明:植物体的某一器官被诱导形成愈伤组织后,其合成原器官次生代谢物的能力极大地降低,而与此同时另一些在植物中含量低的化合物却在器官愈合过程中大量合成。赵剑等人在培养基上诱导长春花叶片愈伤组织发生的过程中,发现叶片中的文多灵与长春质碱迅速降低至极低水平[2]。而文多灵与长春质碱可偶合为长春碱[2]。本实验中,高压处理后的长春花植株可能会形成愈伤组织、使生长发育受到抑制。这种现象与长春碱含量增加也有一定对应关系。因此,我们认为高压处理后的长春花植株的长春碱含量显著增加可以解释为:高压破坏了长春花种子的细胞膜,使植株的某些器官容易形成愈伤组织,从而导致合成的次生代谢物长春碱增加。但是,这样的解释还有待对种子细胞膜等结构以及愈伤组织的详细观察分析才能证实。

长春新碱在植株中的含量非常低,仅为百万分之几。在实验中对长春新碱检测数据的精度还有待

进一步提高。对长春新碱的合成机理也还有待进一步研究。

以上实验结果表明:静高压氮气处理种子对提高长春花植株内长春碱含量有明显的作用;对提高长春新碱含量的作用还需进一步证实。联系到高压处理种子后长春花植株生长性状的改变,初步认为植株体内长春碱含量的提高可能与高压导致的愈伤组织有关。

致谢:本实验室刘福生研究员和薛学东工程师、成都中医药大学博士生龚立同学对本工作给予了大力支持和帮助,中国科学院广州地球化学研究所翁克难教授、徐世平研究员、中国科学院华南植物研究所白成科同志对本工作提出过宝贵的意见和建议,经福谦院士对本工作给予了热情的支持和鼓励,在此深表感谢。

References:

[1] Wang S F, Wang N N, Wang Y, et al. Studies on the Enhancing Accumulation of Indole Alkaloids in Crown Gall Cells of Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus*) [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1999, 30(2): 130-132. (in Chinese)
王淑芳,王宁宁,王　勇,等. 提高长春花冠瘿细胞中吲哚生物碱含量的研究 [J]. 中草药,1999,30(2):130-132.

[2] Zhao J, Wang W K, Zhu W H, et al. Regulation of Indole Alkaloids Synthesis and Related Enzymes During Callus Initiation and Culture of Madagascar Periwinkle Leaves (*Catharanthus roseus*) [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1999, 30(7): 533-537. (in Chinese)
赵　剑,王文科,朱蔚华,等. 长春花叶片愈伤组织诱导及培养过程中生物碱合成类型的变化和调节及有关酶的分析 [J]. 中草药,1999,30(7):533-537.

[3] Zhang L Q, Guo B, Li H Y, et al. Preliminary Study on the Isolation of Entophytic Fungus of *Catharanthus roseus* and Its Fermentation to Produce Products of Therapeutic Value [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2000, 11(31): 805-807. (in Chinese)
张玲琪,郭　波,李海燕,等. 长春花内生真菌的分离及其发酵产生药用成分的初步研究 [J]. 中草药,2000,11(31):805-807.

[4] Zhang H, Yu R M. The Ri Plasmid of Agrobacterium Rhizogenes and Its Application to Plant Secondary Metabolites [J]. Shenyang Pharmaceutical University Transactions, 2000, 17(4): 306-308. (in Chinese)
张　辉,于荣敏. 发根农杆菌 Ri 质粒及其在植物次生代谢产物研究中的应用 [J]. 沈阳药科大学学报,2000,17(4):306-308.

[5] Xu S P, Liao Y P, Xiao W S, et al. Effects of High Pressure on the Growth and Development of Rice [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 1999, 13(Suppl): 58-62. (in Chinese)
徐世平,廖耀平,肖万生,等. 高压对水稻生长发育的影响 [J]. 高压物理学报,1999,13(增刊):58-62.

[6] Bai C K, Li G S, Peng C L, et al. Preliminary Study of Rice Mutants Induced by High Hydrostatic Pressure [J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2003, 11(2): 132-136. (in Chinese)
白成科,李桂双,彭长连,等. 静高水压诱导水稻变异的初步研究 [J]. 热带亚热带植物学报,2003,11(2):132-136.

[7] Zhai H W. Cutting Flower and Floriculture [M]. Tianjing: Tianjing Science and Technology Publishing Company, 2001: 199. (in Chinese)
翟洪武. 切花养花 [M]. 天津:天津科技出版社,2001:199.

[8] Saltveit M E. Effect of High Pressure Gas Atmospheres and Anaesthetics on Chilling Injury of Plants [J]. J Exp Bot, 1993, 44(265): 1361-1368.

[9] Li G S, Bai C K, Duan J, et al. Effect of High Hydrostatic Pressure Treatment on Physiological Characteristics of Rice Plants [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2003, 17(2): 122-128. (in Chinese)
李桂双,白成科,段　俊,等. 静水高压处理对水稻植株生理特性的影响 [J]. 高压物理学报,2003,17(2):122-128.

Effect of High Pressure Treating *Catharanthus Roseus* Seeds on Enhancing Content of *Vinblastine* in the Plant

CHEN Li-Ying[1,2], WU Xue-Hua[1], LIU Xiu-Ru[1], SU Lei[1],
HONG Shi-Ming[1], LIANG Heng-Xing[3], GUO Li[3]

(1. *Laboratory of High Pressure Physics, Southwest Jiaotong University, Chengdu* 610031, *China*;
2. *School of Science, Wuhan University of Technology, Wuhan* 430070, *China*;
3. *Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu* 610075, *China*)

Abstract: Three groups of short annual *Catharanthus roseus* seeds were treated in high pressure nitrogen gas for 4 h at room temperature; the pressure was 10, 20 and 30 MPa, respectively. Other untreated seeds were regarded as a control group (abbreviated to CP). All seeds were planted under same condition. The vegetal character of the *Catharanthus roseus* was observed in detail and contents of *Vinblastine* and *Vincristine* in the plants were detected by HPLC. Experimental results indicated that the contents of *Vinblastine* increased remarkably and *Vincristine* tended to increase in the plants of the pressure treated groups in comparison to CP. It is also noticed that distributions of variance of the flowers and ill aftergrowth plants are corresponding approximately to that of the contents of *Vinblastine*. Mechanism of the effects of pressure treatment was discussed qualitatively.

Key words: *catharanthus roseus*; high pressure; *vinblastine*; *vincristine*