

电刺激对铁皮石斛原球茎中石斛碱含量的影响

何清英, 罗志华, 林棉杰, 陈俊杰, 邓秋怡, 温斌, 陈珺* (广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东广州 510006)

摘要 [目的]探讨电刺激对铁皮石斛原球茎中石斛碱含量的影响。[方法]采用铁皮石斛原球茎培养基扩增培养铁皮石斛原球茎,并将扩增所得原球茎随机分为试验组和对照组,其中试验组给予不同时间电刺激(25 V),对照组不做处理,正常培养15 d后,以氯仿热回流法提取原球茎中的石斛碱,紫外分光光度法测定石斛碱含量。[结果]与对照组相比,经电刺激(25 V)1和2 h的试验组铁皮石斛原球茎石斛碱含量显著增加($P < 0.05$),而经电刺激(25 V)3 h的试验组铁皮石斛原球茎石斛碱含量下降($P < 0.05$)。[结论]25 V电刺激1、2 h能够促进铁皮石斛原球茎中的石斛碱积累,这可能与电刺激能改变原球茎中细胞的渗透性、增强对培养基中各种成分的吸收,导致内源次生代谢物增加有关。

关键词 铁皮石斛;原球茎;电刺激;石斛碱;紫外分光光度法

中图分类号 S567.23*9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)07-0114-02

Effects of Electrostimulation on Dendrobine Content in Protocorm of *Dendrobium officinale*

HE Qing-ying, LUO Zhi-hua, LIN Mian-jie, CHEN Jun* et al (School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510006)

Abstract [Objective] To investigate the effects of electrostimulation on dendrobine content in protocorm of *Dendrobium officinale*. [Method] Protocorms were cultured by protocorm culture medium and randomly divided into two groups, the experimental group was treated with electrostimulation (25 V) while the control group did not be disposed. After 15 days incubation, dendrobine was extracted by chloroform and hot-refluxing, and determined by ultraviolet spectrophotometry. [Result] Compared with the control group, the dendrobine content of experimental group treated with electrostimulation (25 V) for 1 h or 2 h was increased significantly ($P < 0.05$), while the dendrobine content was decreased ($P < 0.05$) in experimental group treated by electrostimulation (25 V) for 3 h. [Conclusion] The electrostimulation (25 V) for 1 h or 2 h can promote the accumulation of dendrobine in protocorm, and the mechanism may be related to the changed permeability of cell, the enhanced absorption of nutrients and the increased endogenous secondary metabolites.

Key words *Dendrobium officinale*; Protocorm; Electrostimulation; Dendrobine; Ultraviolet spectrophotometry

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)是兰科石斛属多年生附生草本植物,具有滋阴、益胃、生津止渴、润肺止咳、强壮及增强免疫活性的作用。石斛碱作为铁皮石斛药用成分之一,具有抗肿瘤、抗衰老等作用^[1-2],但铁皮石斛中石斛碱的含量相对较少^[3],因此,通过探寻合适的方法来提高石斛碱含量具有重要的意义。

近年来,电刺激对植物生长的影响研究就一直受到关注^[4-6],潘学武等^[7]研究发现微交流电刺激可使红豆杉悬浮培养细胞的紫杉醇含量提高3倍多,而脉冲电刺激处理组则提高了7~9倍。为了探究电刺激法是否可以运用于提高铁皮石斛原球茎的石斛碱含量,该研究通过使用25 V交流电对铁皮石斛原球茎进行不同时间段的刺激,并且培养15 d后,检测其石斛碱含量。

1 材料与方法

1.1 试材 铁皮石斛原球茎,购自澄思源生物科技(上海)有限公司,经鉴定为天目山铁皮石斛原球茎。铁皮石斛石斛碱标准品(MUST-12080608),纯度99.99%,购自广州市药检所;溴甲酚绿(天津市大茂化学试剂厂,20130510)。

1.2 主要仪器设备 电刺激仪—交流变压器(上海征西电气科技有限公司, BK-200VA型),分析天平(中韩合资科威电子仪器有限公司, AK-1200型),紫外可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司, WFZ UV-2000型]。

基金项目 广东药科大学大学生创新创业训练计划项目(国家级/省级, 201410573006)。

作者简介 何清英(1993—),女,广东南雄人,硕士研究生,研究方向:植物组织培养。*通讯作者,副教授,硕士,硕士生导师,从事药理学研究。

收稿日期 2017-01-03

1.3 试验方法

1.3.1 铁皮石斛原球茎的扩增培养。参考前人研究的原球茎的增殖扩增培养方案^[8-10],结合以往经验,设计了9种不同的MS培养基(表1),分别进行原球茎扩增培养,得出最佳扩增培养基配方,此配方也用于后续电刺激试验后的继续培养。

表1 铁皮石斛原球茎诱导增殖培养基

Table 1 Culture medium for protocorm of *Dendrobium officinale*

培养基编号 Culture medium No.	NAA mg/L	6-BA mg/L	KT mg/L	蔗糖 Sucrose %	琼脂 Agar %
①	0.50	1.5	—	3	0.7
②	1.00	2.0	—	3	0.7
③	0.10	—	0.5	3	0.7
④	0.20	—	0.5	3	0.7
⑤	0.10	1.0	—	3	0.7
⑥	0.02	—	0.2	3	0.7
⑦	0.20	0.5	—	3	0.7
⑧	0.20	0.1	—	3	0.7
⑨	0.20	2.5	—	3	0.7

1.3.2 标准曲线绘制。参照徐宁^[11]的方法,精称石斛碱对照品5 mg,置50.0 mL容量瓶,加氯仿定容至刻度,配成100 mg/L的石斛碱氯仿溶液,分别在6个10 mL容量瓶中加入石斛碱氯仿溶液0、1、2、3、4、5 mL,用氯仿定容至10 mL,将容量瓶中的溶液移至分液漏斗中,再加入pH缓冲液5.0 mL和1.0 mL 0.04%溴甲酚绿溶液,剧烈振摇3 min,静置30 min,将氯仿层通过药棉(事先已浸泡过氯仿并干燥)过滤,取续滤液5.0 mL,再加入0.01 mol/L氢氧化钠无水乙醇

溶液 1.0 mL,充分摇匀,于波长 620 nm 处测定吸光度,以所测得的吸光度为纵坐标、对应的石斛碱浓度为横坐标绘制标准曲线。

1.3.3 电刺激试验与原球茎样品制备。

1.3.3.1 铁皮石斛原球茎的电刺激试验。选取同一批次扩增培养的铁皮石斛原球茎,随机均分等量平行进行 3 次试验,随机分为 6 组:1 h 试验组与 1 h 对照组、2 h 试验组与 2 h 对照组、3 h 试验组与 3 h 对照组。试验组分别进行 1、2、3 h 电刺激处理,电刺激强度均为 25 V;对照组不做电刺激处理,其余条件与试验组保持一致。将各组原球茎均接种至固体培养基中扩增培养 15 d。

1.3.3.2 检测石斛碱含量。经扩增培养 15 d 后,取出各组原球茎,置于 95~110 °C 温度下杀青 0.5 h,60 °C 条件下干燥过夜,经研磨成粉,过 60 目筛备用。参照徐宁^[11]的方法,称取样品粉末并记录重量。再用 5 mL 氨水浸湿样品 30 min (保持密封状态),精密量取加入 10.0 mL 氯仿,并且称重记录。水浴回流加热 2 h,冷却后称重,用氯仿补充至原重,摇匀,过滤,接收续滤液,并记录体积。精密量取 3 mL 续滤液并定容至 10 mL 容量瓶,按“1.3.2”方法,加入缓冲液和溴甲酚绿溶液,显色后,于波长 620 nm 处测其吸光度。

1.4 数据处理 所有参数均用 $\bar{x} \pm S$ 表示,用 SPSS 软件进行统计分析,LSD-*t* 检验法比较组间的变量差异, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛原球茎的扩增培养基配方 多次试验发现,铁皮石斛原球茎在配方②MS 固体培养基中(含 2.0 mg/L 6-BA、1.0 mg/L NAA、3% 蔗糖、0.7% 琼脂)颜色翠绿、疏松,生长状态好,说明该配方适合原球茎扩增。因此,后续试验中均以此配方进行原球茎培养。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系。按“1.3.2”方法绘制标准曲线,重复试验 5 次,以石斛碱浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线(图 1),得出石斛碱的线性回归方程为 $y = 0.0067x + 0.0042$ ($r = 0.9996$),表明石斛碱浓度在 1~5 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好,适用于计算样品中石斛碱含量。

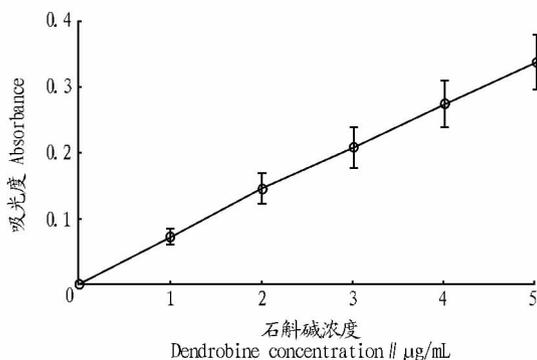


图 1 石斛碱标准曲线

Fig. 1 Standard curve of dendrobine

2.2.2 显色稳定性试验。以石斛碱标准品制备供试品溶液

(3.0 $\mu\text{g/mL}$),按线性关系标准曲线的制作方法操作,加入氢氧化钠无水乙醇溶液后,在 0、15、30、60 和 120 min 时分别测定溶液吸光度,结果发现,加入氢氧化钠无水乙醇 30 min 内显色稳定,超过 30 min 后变动较大,故需及时测定。这与李亚芳等^[12]的研究结果一致。氢氧化钠的无水乙醇溶液主要是通过调整溶液 pH 而影响显色,因无水乙醇挥发性很强,要求加入氢氧化钠、无水乙醇溶液充分振荡混匀后即时测定,同批次试验时要安排好不同样品的测定顺序,确保显色反应时间一致。

2.2.3 精密性、重复性试验。以石斛碱标准品制备供试品溶液(3.0 $\mu\text{g/mL}$),分别进行精密性试验(取同一批供试品溶液连续测定 5 次)和重复性(取同一批供试品平行制备 5 份供试品溶液,分别测定)试验。结果发现,精密性试验中 RSD 为 1.72%,表明该方法精密性良好;重复性试验中 RSD 为 2.55%,表明该方法重复性良好。

2.2.4 回收率试验。取过 60 目筛后的铁皮石斛原球茎样品粉末,称重并从中分取 2 份各 0.3 g,其中 1 份样品粉末按“1.3.3.2”方法制备成待测样品溶液并进行含量测定,测得吸光度并计算石斛碱含量 M_1 ;取另一份样品粉末,加入与 M_1 质量相当的石斛碱标准品 M_s ,按“1.3.3.2”方法制备待测样品溶液并进行含量测定,测得吸光度并计算石斛碱含量 M_2 ,平行测定 5 组样品,计算回收率。由表 2 可见,平均回收率为 109.33%,RSD 为 2.82%,表明该方法可行,且回收率较好。

表 2 加样回收试验

Table 2 Spiked recovery test

组别 Group	M_1 mg	M_s mg	M_2 mg	回收率 Recovery // %
1	0.048 7	0.048 7	0.100 2	105.70
2	0.050 1	0.050 1	0.103 3	106.44
3	0.062 1	0.062 1	0.131 6	111.67
4	0.057 2	0.057 2	0.120 4	110.33
5	0.076 0	0.076 0	0.161 6	112.49

2.3 电刺激对生物碱含量的影响 试验结果表明,试验组 1 (电刺激 1 h)和试验组 2 (电刺激 2 h)铁皮石斛原球茎的石斛碱含量均明显高于对照组($P < 0.05$);而试验组 3 (电刺激 3 h)的石斛碱含量显著低于对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

辛明等^[13]分析发现,不同干燥工艺(热风干燥、真空干燥、真空冷冻干燥、自然晾干)对石斛碱含量无影响,认为生物碱在石斛植物衰老死亡过程中其总量是不变的,因此电刺激后的石斛碱经高温杀青后采取热风干燥以保证时间效率。徐宁^[11]、李亚芳等^[12]的氯仿热提取方案能够有效提取出石斛碱,且经提取 2、3 h 的石斛碱含量无显著性差异,因此该试验采用 2 h 氯仿热回流提取样品中的石斛碱。

近几年来,国内外许多学者通过外加恒压或恒流的方式展开电刺激对植物生长影响的探究,即对植物外加高压静电场进行刺激或通过外加平衡电流进行刺激。细胞在一定的刺

(下转第 156 页)

表1 四川盆地山丘区乡村景观特色化模式

Table 1 Characteristics of rural landscape in hilly area of Sichuan Basin

序号 No.	类型 Type	模式特点 Mode characteristics	自然特征 Natural features	人文性 Humanity	经济性 Economic	科技性 Technology	市场性 Marketability	推广性 Generalization	运行性 Operational
1	乡村景观景区 化模式	以景区为依托	丘陵、山地;海拔 500 ~ 2 300 m;资源丰富	较强	强	一般	强	较强	强
2	观光农业模式	以产业为依托	浅丘、中丘;海拔 500 ~ 900 m;资源丰富	一般	强	强	强	强	强
3	休闲农业郊游 模式	以郊游为依托	丘陵、山地;海拔 600 ~ 1 500 m;资源丰富	一般	强	一般	强	强	较强
4	乡村聚落模式	以文化为依托	丘陵、山地;海拔 600 ~ 1 500 m;资源丰富	强	较强	一般	较强	较强	较强

观设计和构建模式提供了借鉴。需要注意的是,各地区由于实际情况不同,应根据自身特点和发展目标加以适度借鉴。

参考文献

- [1] 蔡军, 文华相, 潘远智. 四川乡村景观灾后重建规划的社区参与机制及保障措施探析[J]. 北方园艺, 2010(22): 209-211.
- [2] 许文炜, 黄建云. 基于乡村环境意象的新农村景观规划设计探讨: 以四川成都“五朵金花”观光休闲农业区为例[J]. 规划师, 2010, 26(5): 36-39.
- [3] 陈睿智, 董靛. 四川盆地边缘乡村生态旅游景观规划研究[J]. 生态经济, 2013(3): 148-151.
- [4] 韦娜, 刘加平. 可持续视野下的乡村聚落景观研究: 以四川大坪村为例[J]. 建筑学报, 2010(S2): 111-113.
- [5] 李蓓蓓. 新农村建设背景下四川山地特色乡村旅游区景观设计分析[J]. 南方农业, 2016, 10(15): 87-89.
- [6] 范颖. 乡村旅游开发指引下的四川村镇聚落景观行变[J]. 山西建筑,

2014, 40(24): 11-13.

- [7] 任平, 周介铭. 四川省经济发展水平区域差异综合评价研究[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2007, 30(1): 102-105.
- [8] 刘黎明. 乡村景观规划[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003.
- [9] 赵伟韬, 陈卉. 我国新型乡村景观发展模式研究[J]. 黑龙江农业科学, 2010(4): 93-96.
- [10] 刘滨谊. 自然原始景观与旅游规划设计: 新疆喀纳斯湖[M]. 南京: 东南大学出版社, 2002.
- [11] 李露, 张玉钧. 乡村景观的生与死: 城镇化背景下我国乡村景观建设模式研究[J]. 建筑与文化, 2016(2): 123-125.
- [12] 孙婷. 龙泉山西部坡丘区旅游开发模式探讨: 以龙泉山泉镇为例[D]. 成都: 成都理工大学, 2009.
- [13] 名山区地方志编撰委员会. 名山区志[M]. 北京: 方志出版社, 2006: 68-69.
- [14] 名山区统计局. 2014年名山区国民经济和社会发展统计公报[R]. 2014.

(上接第115页)

激条件下,膜电位会发生瞬时变化,从而产生动作电位会对细胞的生长发育产生影响。从20世纪80年代开始就有学者探究电刺激对植物愈伤组织的影响^[5-6,14-15],如Rathore等^[15]研究发现对烟草愈伤组织进行 1×10^{-6} A的电流刺激后,可以提高70%的生长速率。戴群等^[4]分析发现小麦原生质体经微直流电刺激后对细胞团的形成有促进作用。潘学武等^[7]研究发现脉冲电刺激可有效提高紫杉醇的胞外释放率,达对照组的4~5倍。而该试验结果表明,25 V电刺激1、2 h对铁皮石斛原球茎中有效成分石斛碱的含量有显著的促进作用($P < 0.05$),但电刺激3 h(25 V)对铁皮石斛原球茎中有效成分石斛碱的含量有显著的抑制作用($P < 0.05$)。赵剑等^[6]认为外加电压影响了细胞的代谢以及多种酶活,初步分析同一电压不同时长下会产生不同的结果是因为在一定时间内电刺激影响了ATP的合成,增加了酶活,从而促进了原球茎中石斛碱含量的产生;超过一定时间后由于电极的发热导致温度上升,影响细胞代谢,降低酶活,导致原球茎中石斛碱含量的降低。表明电刺激法可以提高铁皮石斛原球茎中石斛碱含量。

参考文献

- [1] 施红, 陈玉春. 石斛复方制剂的抗氧化和免疫功能的相关研究[J]. 福

建中医药大学学报, 1997(4): 13-15.

- [2] 王天山, 陆跃鸣, 马国祥, 等. 鼓槌石斛中化学成分对 K_{562} 肿瘤细胞株生长抑制作用体外试验[J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(2): 1-3.
- [3] 王再花, 李杰, 章金辉, 等. 石斛属植物多糖与生物碱含量的比较研究[J]. 中国农学通报, 2015, 31(24): 242-246.
- [4] 戴群, 夏光敏, 郭光沁. 微直流对小麦原生质体形成细胞团的促进作用[J]. 植物学报, 1995, 37(2): 162-164.
- [5] 郭兴明, 郑尔信, 王淑仪. 脉冲电刺激对植物生长的影响研究[J]. 生物医学工程学杂志, 1993, 10(3): 350-359.
- [6] 赵剑, 杨文杰, 马福荣, 等. 高压静电场(HVEF)对苜蓿叶片愈伤组织增殖的影响[J]. 生物物理学报, 1997, 13(2): 255-260.
- [7] 潘学武, 董妍玲. 电刺激对红豆杉悬浮培养细胞产紫杉醇的影响[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(10): 65-68.
- [8] 苏钰, 张晓南. 液体悬浮培养促进铁皮石斛原球茎高效诱导、增殖的研究[J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(4): 54-56.
- [9] 常美花, 金亚征, 王莉. 铁皮石斛快繁技术体系研究[J]. 中草药, 2012, 43(7): 1412-1417.
- [10] 王丽萍, 梁淑云. 铁皮石斛原球茎诱导与增殖研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(1): 265-268.
- [11] 徐宁. 石斛中总生物碱的含量测定方法研究[J]. 基层中药杂志, 2001, 15(3): 24.
- [12] 李亚芳, 张晓华, 孙国明. 石斛中总生物碱和多糖的含量测定[J]. 中国药事, 2002, 16(7): 426-428.
- [13] 辛明, 张娥珍, 李楠, 等. 不同干燥工艺对铁皮石斛多糖及石斛碱的影响[J]. 南方农业学报, 2013, 44(8): 1347-1350.
- [14] DIJAK M, SMITH D L, WILSON T J, et al. Stimulation of direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* [J]. Plant cell reports, 1986, 5(6): 468-470.
- [15] RATHORE K S, GOLDSWORTHY A. Electrical control of growth in plant tissue cultures[J]. Nature biotechnology, 1985, 3: 253-254.