

# 石斛属药用植物生物工程技术研究※

□ 魏小勇<sup>1\*</sup> 方 花<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学基础医学院 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学护理学院 广东 广州 510405)

**摘 要** 本文就近年来国内外有关石斛分子生物学方面研究进行了简要概述, 主要对石斛分子鉴定、基因工程研究进行了总结。同时提出了今后药用石斛分子生物学研究的前景。

**关键词** 石斛 分子鉴定 基因工程

石斛为传统名贵中药材, 为兰科 (orchidaceae) 石斛属 (Dendrobium Sw), 以新鲜或干燥的茎入药, 我国 76 种石斛属植物中有 30 多种作为药用, 著名的有铁皮石斛、金钗石斛、霍山石斛等。它具有“滋阴养胃、清热生津、润肺止咳、明目强身”之功效<sup>[1-3]</sup>, 《神农本草经》中将其列为上品, 被誉为“中华九仙草”之首。药用石斛的有效成分主要是生物碱和多糖。现代药理研究表明, 石斛还具有抗肿瘤、抗衰老、增强机体免疫力、扩张血管及血小板凝集、有效减轻肝损伤等作用, 对眼科疾病也有明显的治疗作用。因此石斛在临床及中医复方中被广泛应用, 如“清睛粉”、“石斛夜光丸”、“脉络宁注射液”、“清咽宁”和“益肠汤”等等。但石斛对生长环境的要求十分严格, 自然条件下, 种子萌发率极低, 生长极缓慢; 另一方面人们过度采挖, 环境的恶化, 石斛资源日趋枯竭<sup>[4-7]</sup>。为保护利用这一珍稀中

药材, 增加产量, 不少学者进行了石斛组织培养快速繁殖研究, 并取得了一定的进展。但试管苗移栽成活率低, 产量低, 目前还没能应用试管苗进行大面积栽培, 因此石斛药源一直处于相当紧张状态, 亟待解决。应用现代生物技术和现代农业技术来解决才是长远之计。本文就石斛分子生物研究情况作一概括。

## 1 石斛的分子鉴定

由于石斛生长环境十分独特, 资源稀少, 加之人为滥采和生长环境破坏, 不少名贵品种已近濒危。目前石斛药材市场出现大量假冒伪劣产品。另外, 石斛属中药品种众多、产地各异, 商品规格极为复杂, 致使石斛成为目前药典收载的中药材中基源最为混乱的品种之一, 对其鉴定与质量评价及辨别真伪历来十分困难。

近年发展的 DNA 指纹图谱技术为生药的分子鉴定提供了可能, 限制性内切酶片段长度多态性 (RFLP)、聚合酶链反应 (PCR)、随机扩增多态性 DNA (RAPD)、扩增的限制性内切酶片段长度多态性 (AFLP) 等分子遗传标记技术已广泛应用于近缘生药

※基金项目 广东省中医药局资助项目 No. 402003, 303005

\* 作者简介 魏小勇 男 医学硕士 讲师 主要从事中药生物工程。

品种的研究, 鉴于分子生物技术在药材质量评价及真伪方面的优势, 分子生物技术在石斛鉴定研究中应用得最多。

DNA 分子标记是石斛鉴定应用最广泛的技术。张铭等<sup>[8]</sup>利用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术对 26 种石斛进行了基因组 DNA 多态性分析并构建了聚类树状图。根据筛选到的 DNA 片段序列, 将 Sangon18 引物从 3' 端延长至 20bp, 设计特异性的引物可高效快速鉴定铁皮石斛。徐红等<sup>[9]</sup>研究黄草石斛 IST 片段遗传多态性, 用一对引物进行 PCR 扩增, 扩增产物纯化后用双脱氧终止法测序, 获得核糖体 DNA 中 IST 和 5.8 SrDNA 完整序列, 14 个石斛类群的 IST1 与 IST2 序列的长度分别为 228 ~ 233bp 和 242 ~ 247bp。用 NJ 法根据 IST1 与 IST2 序列数据重建系统发生树, 发现两序列在石斛种内保守, 种间差异较大, 与外类群的差异最大, 因此可作为黄草石斛分子鉴定的标记。丁小余等建立了 21 种枫斗类石斛的 rDNA IST 序列数据库<sup>[10]</sup>, 对曲茎石斛 (南阳居群)、霍山石斛 (霍山居群)、铁皮石斛 (天台居群) 的 rDNA IST 序列进行比较, 选出了 7 个碱基位点用作鉴别曲茎石斛 (南阳居群) 及其近似品种的 DNA 证据<sup>[11]</sup>。他们<sup>[13,14]</sup>用类似方法挑选 15 个碱基位点作为鉴别束花石斛及其相似品种玫瑰石斛、喇叭石斛、报春石斛、兜唇石斛的 DNA 标记。罗玉明等<sup>[11]</sup>根据细叶石斛及其 37 种石斛的 rDNA IST 序列设计位点特异性 PCR 鉴别引物 XY-JBO1 S 和 XY-JBO1 X, 对细叶石斛进行了成功的鉴别。

腾艳芬等<sup>[12]</sup>通过 matK 基因序列分析石斛及其混品之间的遗传关系, 将正品石斛与伪品区分开来。张尊建<sup>[8]</sup>等建立了密花石斛、马鞭石斛、短棒石斛、鼓槌石斛和金钗石斛等五种石斛的 HPLC/UC 指纹图谱, 为石斛的全面质量控制提供依据。彭锐等<sup>[16]</sup>研究比较不同 DNA 提取方法, 发现在提取石斛属中药 DNA 前加入 CTAB 缓冲液抽提多糖等杂质, 可获得高质量的 DNA。

## 2 基因工程研究

石斛基因工程起步较晚, 进展缓慢。主要是因为石斛属植物对根癌农杆菌或发根农杆菌不敏感, 缺乏合适的载体<sup>[17]</sup>。而一些直接转移法如 PEG 介导和电激

法成功率又不高。因此, 石斛基因工程研究一直不尽人意。在这方面人们对石斛进行了一些尝试。

Yang H H 等<sup>[18]</sup>在石斛中分离出了色素合成基因, 并得到了高效表达。Kuehnle<sup>[19]</sup>等用带有植物表现的 Nos-NPTII 基因和番木瓜病毒 (PRV) 膜蛋白 (CP) 基因的质粒 pGA482GG/cpPRV4 包被的微粒轰击石斛的原球茎进行基因转移实验。通过 4 次杂交得到的近 280 个原球茎被粒子轰击, 转化与否表现在组织是否变绿。培养基为 1/2MS + 2% 蔗糖 + (500 - 100) mg/L 硫酸卡那霉素。PCR 分析表明, 由 2 次杂交得到了 12 株具有卡那霉素耐受性植株带有 Nos-NPT 基因, 而只有 1 株带有 PRVCP 基因。这些结论表明用粒子轰击的方法可以实现单子叶植物石斛的转基因。此外, 石斛属植物转基因组织和植物的筛选还可利用荧光素酶基因做为标记。Chia 等<sup>[20]</sup>用带有 35S-luc 嵌合基因质粒包被的钨颗粒 (1.3 μm) 轰击石斛的原球茎, 3 周后, 向转化组织中加入 1mmol/L 的荧光素, 转化细胞可通过低光视频显微镜及其辅助图象处理设备检测生物性发光素辨别。将转化的组织切割下来培养生长, 然后进行第 2 轮筛选。这样经过 3 轮的生长和筛选后, 表达荧光素酶的组织表明基因在该组织中转化成功。同时 Southern 杂交也证明荧光素酶基因已结合到植物基因组, 该方法也可用于其它植物基因转化的检测。

除了用粒子轰击的方法来进行石斛原球茎转基因的研究外, 有关石斛的研究还涉及了农杆菌介导的转基因。利用根癌农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 侵染宿主植物受伤部位的细胞并产生大量转化毛状根, 与传统的细胞培养技术相比, 转化毛状根具有生长迅速、遗传性状稳定及激素自养型等特点, 克服了植物细胞培养中对原植物激素的依赖性, 是生产次生代谢产物较理想的组织。农杆菌侵染植物的关键之一是细菌侵入性基因诱导物的作用, 诱导物在转化过程中可将 T-DNA 的加下和转运通道激活, 诱导 Vir 区基因的活化表达。在双子叶植物中, 许多天然酚性化合物如乙酰丁香酮、香豆醇和芥子醇等都是已知的细菌侵入性基因的诱导物。但在石斛中, 还没有发现这类诱导物质。Nan<sup>[21]</sup>研究发现在石斛组织培养中原球茎发育早期有大量的松柏醇产生, 可诱导毒性基因的表达。如果将在暗处培养的原球茎转入光照条件下, 其

含量呈 6 倍增加。原球茎松柏醇的产量是叶的 11 倍, 这将使通过农杆菌介导法获得转基因植物, 即将克隆的花色基因、主要药用成分表达基因等通过农杆菌介导法转入石斛原球茎成为可能。但是农杆菌介导的转基因在石斛中并未取得成功, 这个研究结果提示农杆菌对单子叶植物石斛的不敏感性可能存在着新的机制。

### 3 结 语

DNA 分子遗传标记不受形态、来源因素影响, RAPD 方法能有效地鉴别动植物药材, 然而也存在不够稳定、不同实验室间重复性较差等问题。准确鉴别常需要做多次测定。因此最好的方法是筛选到物种的特异性引物进行 PCR 分析或短重复顺序 (SSR) 分析, 只有这样才能满足特异、稳定、便捷鉴别的目的。本研究的目的是在药用石斛 DNA 指纹分析的基础上, 获得鉴别铁皮石斛等名贵品种的特异性引物 (或分子探针), 并建立相配套的便捷的分子检测技术。搞清石斛等的主要药用功能基因结构及表达规律, 有效利用、开发、保护石斛资源, 为中药现代化服务。

石斛分子分析不仅能用于鉴别野生药材和枫斗、石斛粉等加工品, 也可以用于石斛 GAP 的种质检测, 石斛药材道地性分析和变异分析, 有十分明显的理论意义和应用价值。

铁皮石斛为石斛属一种名贵中药, 自然资源稀缺; 人工组培苗移栽成活率低, 不能满足药材市场的需求; 石斛硷为石斛主要药用有效成分之一, 但人工合成成本很高。因此石斛硷相关功能基因的获得, 为下一步通过基因工程大量生产石斛硷奠定基础。我们利用理化因子定向诱导铁皮石斛种胚原球茎已经获得稳定的石斛碱突变体; 运用 cDNA - AFLP 技术、用差异显示对突变体表达进行分析; 以 Mrna - cDNA 克隆法构建铁皮石斛差减 cDNA 文库; 以获得差异表达 mRNA 反义基因构建相应的载体, 转化石斛, 分析转基因石斛的成分石斛硷的变化, 对反义基因进行筛选, 确定石斛硷功能基因; 并进行基因的全长克隆。从而获得石斛硷相关功能基因, 为有效利用、开发、保护及开拓石斛资源创造了条件; 也为探索以突变体和生物检测方法克隆其他中药的有效成分的功能基因探求一条新道路。

万方数据

### 参考文献

- [1] 叶秀麟, 程式均, 王伏雄. 黑节草未成熟种子的形态发育及其在离体培养时的表现. 园艺学报, 1988, 10 (3): 285.
- [2] 魏小勇, 张铭, 黄华荣. 铁皮石斛药用研究进展. 中草药, 2000, 31 (增刊): 189.
- [3] 王康正, 高远文. 石斛属药用植物研究进展. 中草药, 1997, 28 (10): 633.
- [4] 胡忠, 吉星和. 黑节草种苗的大量培养. 植物杂志, 1979 (3): 1.
- [5] 何静波, 李勇. 黑节草原胚体的繁殖. 云南植物研究, 1982, 4 (2): 211.
- [6] 张治国, 刘骅, 王黎, 等. 铁皮石斛原球茎增殖的培养条件研究. 中草药, 1992, 23 (8): 431.
- [7] 郭顺星, 曹文琴, 张集慧, 等. 铁皮石斛人工种子制作流程及发芽研究. 中草药, 1996, 27 (2): 105.
- [8] 张铭, 黄华荣, 廖苏梅, 等. 石斛属 RAPD 分析及鉴定铁皮石斛特异性引物设计. 中国中药杂志, 2001, 26 (7): 442.
- [9] 徐红, 李晓波, 丁小余, 等. 中药黄草石斛 rDNAITS 序列分析. 药学学报, 2001, 36 (10): 777.
- [10] 丁小余, 徐璐珊, 徐红, 等. 曲茎石斛及其近似种鉴别的形态和 DNA 分子证据. 药学报, 2001, 36 (11): 868.
- [11] 罗玉明, 丁小余, 徐璐珊, 等. 细叶石斛的位点特异性 PCR 鉴别. 淮阴师范学院学报 (自然科学版), 2002, 1 (1): 82.
- [12] 滕艳芬, 吴晓俊, 徐红, 等. 石斛及其常见混淆品的 matK 基因序列比较. 中国药科大学学报, 2002, 33 (4): 280.
- [13] 丁小余, 徐璐珊, 王峥涛, 等. 束花石斛及其相似种的 DNA 分子鉴别. 中国中药杂志, 2002, 27 (6): 407.
- [14] 丁小余, 王峥涛, 徐红, 等. 枫斗类石斛 rDNAITS 区的全序列数据库及其序列分析鉴别. 药学报, 2002, 37 (7): 567.
- [15] 张尊建, 王源园, 李茜. 五种石斛的指纹图谱研究. 中国药科大学学报, 2003, 34 (6): 534.
- [16] 彭锐, 宋洪元, 李泉森, 等. 石斛总 DNA 的提取及鉴定. 中国中药杂志, 2003, 28 (12): 1129.
- [17] 丁兰, 付庭治. 兰花生物工程研究进展. 西北师范大学学报 (自然科学版), 2000, 36 (3): 111.
- [18] Yang Hun - heng, chua N H. Isolation and characterization of genes involved in the pigment biosynthesis of orchids [C]. Proceedings of 13th World Orchid Conference, 1990. 48.
- [19] Kuehnle A, Cheng S, Zhang G, et al. Transformation of Dendrobium orchid using particle bombardment of protoplasts. Plant Cell Reports, 1992, 11 (9): 484.
- [20] Chia T. F, Gifford D J, Gou X P, et al. The fire luciferase gene as a non - invasive report for Dendrobium transformation. Plant Journal. 1994, 6 (3): 441.
- [21] Nan G. L, Wang S - H, Williams C M, et al. Dendrobium orchids maintain an inducer of Agrobacterium virulence genus. Physiological and Molecular Plant Pathology, 197, 51 (6): 391.