



草珊瑚植物叶、茎显微结构与黄酮 组织化学定位研究

葛楚源, 陈文列*, 李钻芳, 廖乃顺, 黄云梅, 梁一池, 刘献祥

(福建中医药大学 福建中西医结合研究院, 福建 福州 350108)

[摘要] 目的:以药用植物草珊瑚叶、茎为材料,研究黄酮类物质在其中的分布。方法:在观察草珊瑚植物叶、茎显微结构的基础上,用NaOH显色和醋酸镁甲醇液显色的组织化学方法进行黄酮类化合物定位。结果:黄酮类化合物在叶中主要分布在表皮和位于上下表皮内的厚角组织、类栅栏组织、维管束、分泌细胞中;在茎中主要分布在表皮、厚角组织、分泌细胞、韧皮部。结论:黄酮类化合物的NaOH显色法,相对其他以醇类为显色剂溶剂的荧光显色法是较为简便可行、定性迅速的组化鉴定方法。叶中黄酮含量高于茎部。因此,若以总黄酮为草珊瑚有效成分,可以只采收叶,保留其根部和茎部,以达到可持续性有效利用中药资源的目的。

[关键词] 草珊瑚;显微结构;黄酮类化合物;组织化学定位;显微鉴定

草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai, 属于金粟兰科 Chloranthaceae 草珊瑚属 *Sarcandra*, 又名肿节风、九节茶、接骨木等,在我国分布广泛且资源丰富。传统中医药理论认为其味苦辛、性平、有小毒,有祛风通络、活血散瘀、止血止痛、接骨续筋之功用。现代药理学研究也表明草珊瑚具有良好的药用价值^[1],且安全无明显毒性^[2-3],临床应用广泛。有文献记载黄酮类化合物是草珊瑚中含量最多、最主要的药用有效成分之一^[4]。草珊瑚各部位的总黄酮含量于叶 > 根 > 茎^[5]。草珊瑚中的总黄酮包括二氢查耳酮、二氢黄酮、二氢异黄酮、黄酮苷类等^[2],具多种生物活性^[6]。本研究采用植物显微技术和组织化学方法,对草珊瑚的显微结构特征、叶及茎中黄酮类物质贮藏的结构场所进行研究,以期草珊瑚的生药鉴定、选择合理药用部位进行采收和加工,提供显微结构、组织化学的理论依据。

1 材料

草珊瑚 *S. glabra* 的叶、茎,于2011年3月采自福建中医药大学时珍园的草珊瑚植株(梁一池教授鉴定)。试剂均为分析纯。万能研究显微镜

(OLYMPUS公司 AHB-LB-1 型)及 CCD 显微图像采集系统(厦门麦克奥迪公司 Moticam5000c 型)、数码荧光显微镜(美国 AMG 公司 EVOS-fl 型)。

2 方法

2.1 植物显微结构

采用石蜡切片法^[7],选择生长健壮的植株,观察并描述其植物形态;在其叶、茎中部取材,切成5 mm左右小段,用FAA固定48 h,乙醇梯度脱水,番红染色,二甲苯透明,浸蜡,包埋;切片厚度为10 μm,脱蜡,固绿染色,中性树脂胶封片,显微镜观察并照相。

2.2 黄酮组织化学定位

2.2.1 NaOH 显色法^[8] 对实验材料进行徒手切片,并放置于载玻片上,滴加5% NaOH 溶液,处理10 min,使切片中黄酮显色,制成临时装片;显微镜观察并照相。

2.2.2 醋酸镁甲醇溶液显色^[9] 对实验材料进行徒手切片,并放置于载玻片上,滴加1%醋酸镁甲醇溶液,处理30 s,使切片中黄酮显色,制成临时装片;荧光显微镜下(激发波长405~480 nm,发射波长520 nm)观察并照相。

3 结果

3.1 显微结构

3.1.1 叶横切面 表皮细胞方形或长方形,外被角质层,角质层锯齿状,上下表皮均可见气孔,主脉向上方略隆起,向下方显著突出。主脉表皮内侧有

[稿件编号] 20110716009

[基金项目] 陈可冀中西医结合发展基金项目(CKJ2010034);福建省教育厅科技重点项目(JA10160)

[通信作者] *陈文列,研究员,研究方向为组织、细胞结构与功能研究,E-mail: chen.wl@163.com



3.2.2 荧光下黄酮类化合物的定位 在蓝紫光(405~480 nm)激发下,黄酮类化合物主要在叶、茎的表皮处显现绿色荧光,其他部位荧光均很微弱。而在表皮中显现荧光的主要是表皮细胞的细胞壁(图1-9)。

4 讨论

4.1 草珊瑚叶、茎显微结构特点

草珊瑚叶、茎的表皮细胞均具有明显较厚的角质层,并且角质层有时呈锯齿状;木质部多为管胞,少见导管。茎皮层及髓部分布有石细胞、分泌细胞;而叶上表皮内侧的1~2层细胞,排列紧密,呈类圆形,可以认为这是分化不完全的栅栏组织,石祥刚等称之为类栅栏组织^[10]是较为妥当的。海绵组织细胞空隙发达。这些结构特点与草珊瑚适宜温暖湿润气候,喜阴凉环境,忌强光直射和高温干燥的生长习性相适应,与文献中的报道吻合^[10-13],因此,这些叶、茎显微结构的特点可作为草珊瑚生药鉴定的依据。

4.2 草珊瑚叶、茎中黄酮的分布

草珊瑚内总黄酮的NaOH显色结果,表明草珊瑚叶、茎中黄酮的含量较为丰富。黄酮类化合物在叶中主要分布在表皮和位于上下表皮内的厚角组织、类栅栏组织、维管束、分泌细胞中;在茎中主要分布在表皮、厚角组织、分泌细胞、韧皮部。从显色面积来看,叶着色面积大,茎中占较大面积的皮层和髓部几乎没有着色,因此,经重复实验后可初步判断草珊瑚叶中的黄酮含量要远高于茎。这与紫外分光光度法定量测定的叶中黄酮高于茎的报道^[4-5]相吻合。

NaOH溶液可以与不同黄酮类化合物产生颜色反应,例如,与二氢黄酮类反应显橙黄色,久置变鲜红色,而与查耳酮反应呈红色,久置红色加深;同时还可以对徒手切片起到一定的透化作用,更便于观察。然而,NaOH溶液不是黄酮类化合物专属显色剂,除黄酮类化合物,许多其他类化合物也能与之反应,故在许多中药有效成分的鉴定剂中常配有NaOH,但其通常用于催化显色反应或使化合物水解开环便于与显色剂结合,并不能直接显色。羟基醌类能和碱性溶液发生颜色改变,多呈橙、红、紫红、蓝色,中草药组织化学研究中就常利用这一性质,以NaOH溶液显色来鉴定羟基蒽醌^[14-16]。草珊瑚中至今没有发现过羟基醌类物质^[1-2],所以这并不会对本研究的准确性造成影响。因此,用NaOH显色法定

位黄酮类物质是较为简便可行、定性迅速的,但是用于其他中草药研究时要注意,应考虑到羟基醌类和黄酮类同时存在会影响到实验结果。

醋酸镁甲醇溶液的定位黄酮的结果与NaOH法略有所不同。醋酸镁甲醇溶液主要是用来与二氢黄酮和二氢黄酮醇类反应,产生荧光。因此,结合NaOH法的结果,可以认为,草珊瑚中的二氢黄酮和二氢黄酮醇类物质主要分布于叶、茎的表皮细胞的细胞壁中;其余的黄酮类物质(主要是查耳酮),则主要分布于叶的类栅栏组织、分泌细胞,茎的厚角组织、分泌细胞的整个细胞中。

国外对于黄酮类化合物的组织化学研究,常用DPBA(diphenylboric acid 2-aminoethyl ester,其1%的醇溶液称为如Naturstoffreagenz A^[17]或者Neu's reagent^[18])。它能和不同黄酮类化合物产生不同颜色的荧光^[19-20],并对植物组织内木质素等产生的自发荧光也有增强效果^[21],使用起来较为复杂;且配合冰冻切片,激光扫描共聚焦显微镜观察效果较好,但这使得实验时间变长,成本上升;最重要是甲醇乙醇易挥发,且溶解黄酮类物质能力很强,作为显色剂的溶剂,染色时会使黄酮被溶出并扩散,造成黄酮定位不准确。

黄酮类化合物在植物体内的生物合成途径是复合型的,即分别经莽草酸途径和乙酸-丙二酸途径,在查耳酮合成酶的作用下生成查耳酮,再经过异构化酶的作用形成二氢黄酮。再由二氢黄酮在各种酶作用下经转化而得到其他类型黄酮类化合物。因此可以推断出,草珊瑚叶、茎中的黄酮类化合物,由分泌细胞等作为代谢产物生成并贮存,而在表皮细胞转化为构成细胞壁的物质来加以利用。

4.3 草珊瑚叶、茎结构与黄酮分布的相关性及其意义

黄酮类化合物是植物界分布较为广泛的一大类天然酚性化合物,是药用植物中主要活性成分之一,也是植物自我防御系统的重要物质基础之一。分布于表皮、厚角组织等外部组织的黄酮,具有防止外界微生物的入侵、抗紫外等保护作用;而草珊瑚的分泌细胞大多为单宁细胞,单宁为合成黄酮的前体,黄酮合成并储存于这些分泌细胞,也是其自我保护的一种表现。

草珊瑚总黄酮具有抗菌消炎、清热解毒、抗多种肿瘤、促进骨折愈合、改善血液循环、镇痛、抗疲劳、



抗氧化、抑制流感病毒等多种生物活性^[6]。若以总黄酮为有效成分,药用部位可以考虑只采收草珊瑚叶,保留其根及茎部,以达到可持续性地有效利用中药资源的目的。

[致谢] 本实验在国家中医药三级科研实验室——中药药理(细胞结构与功能)实验室完成。

[参考文献]

- [1] 郁建生,李英伦. 草珊瑚研究进展[J]. 安徽农业科学,2005,33(12):2390.
- [2] 胡晓茹,许旭东,杨峻山. 草珊瑚的研究概况[J]. 中国药学杂志,2008,43(10):721.
- [3] 孙建琴,孙晓红,王惠群,等. 草珊瑚的毒性研究[J]. 贵阳医学院学报,1998,23(1):43.
- [4] 郁建生,郁建平. 草珊瑚总黄酮提取工艺及其含量动态变化[J]. 中国中药杂志,2007,32(4):307.
- [5] 李成仁,王园园,李小艳,等. 肿节风药材采收部位与最佳采收期的研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(3):586.
- [6] 郁建生,罗显华. 草珊瑚总黄酮稳定性研究[J]. 食品科学,2007,28(4):44.
- [7] 徐青. 植物石蜡切片双重染色技术的改进[J]. 宁夏农学院学报,1999,20(2):89.
- [8] 谭玲玲,胡正海,蔡霞,等. 北柴胡营养器官中主要化学成分的组织化学定位及其含量比较[J]. 分子细胞生物学报,2007,40(4):214.
- [9] Ni X L, Peng L, Liu W Z. Structures, components and functions of secretory tissues in *Houttuynia cordata*[J]. J Integrative Plant Biol,2007,49(12):1734.
- [10] 石祥刚,李小艳,宋晓虹,等. 中草药肿节风的解剖结构及显微鉴定[J]. 中山大学学报,2008,47(增):48.
- [11] 李松林,乔传卓,苏中武,等. 草珊瑚的生药鉴定[J]. 中

材,1991,14(11):20.

- [12] 李松林,乔传卓,苏中武,等. 草珊瑚属导管分子的研究[J]. 第二军医大学学报,1991,12(4):354.
- [13] 王汉章,周国平,吴达成,等. 肿节风显微及薄层鉴别[J]. 中药材,1999,22(12):619.
- [14] 沈宗根,吕洪飞, Gutterman Yitzchak, 等. 芦荟属植物叶内蒽醌类物质的组织化学定位研究[J]. 西北植物学报,2002,22(6):1384.
- [15] 刘文哲,张爱新. 大黄蒽醌类化合物的组织化学定位研究[J]. 西北植物学报,2000,20(6):1082.
- [16] 谭凯丽,廖海民. 何首乌营养器官的解剖学与蒽醌类物质组织化学研究[J]. 贵州农业科学,2010,38(2):32.
- [17] Tattini M, Gravano E, Pinelli P, et al. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation [J]. New Phytol, 2000, 148(1): 69.
- [18] Valette C, Andary C, Geiger J P, Sarah J L, et al. Histochemical and cytochemical investigations of phenols in roots of banana infected by the burrowing nematode *Radopholus similis*[J]. Phytopathology, 1998, 88(11): 1143.
- [19] Buer C S, Muday G K, Djordjevic M A. Flavonoids are differentially taken up and transported long distances in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2007, 145(2): 478.
- [20] Peer W A, Bandyopadhyay A, Blakeslee J J, et al. Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, 2004, 16(7): 1898.
- [21] Wasson A P, Pellerone F I, Mathesius U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia [J]. Plant Cell, 2006, 18(7): 1617.

Microstructure and histochemical localization of flavonoids in leaves and stem in *Sarcandra glabra*

GE Chuyuan, CHEN Wenlie*, LI Zuanfang, LIAO Naishun, HUANG Yunmei, LIANG Yichi, LIU Xianxiang
(Fujian Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] Microscopic and histochemical methods were used to investigate flavonoids localization in the leaf and the stem of the *Sarcandra glabra*. The results indicated that flavonoids distributed mainly in epidermis, collenchyma, vascular bundles, secretory cells and palisade tissue of leaf. In the stem, they distributed mainly in epidermis, collenchyma, phloem and secretory cells. Histochemical localization of flavonoids using 5% solution of NaOH is convenient, rapid and reliable. The content of flavonoids in the leaf was higher those than in the stem. For sustainable utilization of the resources we suggested that only the leaves could be harvested.

[Key words] *Sarcandra glabra*; microstructure; flavonoids; histochemical localization; microscopic identification

doi:10.4268/cjmm20120406