

· 译文与文摘 ·

人参细胞悬浮培养法生产皂甙

T. Furuya, T. Yoshikawa, Y. Orihara & H. Oda

引 言

人参根在中国和日本是名贵的药物，被认为具有滋补和强壮的作用。

许多研究者已作了人参皂甙和皂甙元的化学和药理方面的研究，并肯定了人参皂甙中人参皂甙 Rb₁ 和 Rg₁ 是最有效的成份。

关于从人参愈伤组织中分离人参萜二醇、人参萜三醇、齐墩果酸、人参皂甙 Rb₁ 和 Rg₁，植物生长素对生长和皂甙产量的影响，以及在人参愈伤组织培养中，生物合成的前体和某些生物调节剂对皂甙生产的调节作用等已有了报导。

本文详细描述人参的各种静态和悬浮培养法对于细胞生长和皂甙生产的较好培养条件。

材料和方法

材料和培养方法

人参愈伤组织培养的开始和维持如前文所述*。本实验使用的人参为在朝鲜栽培的5年参根。所使用的植物激素为 IAA (吲哚-3-乙酸), NAA (奈乙酸), 2,4-D (2,4-二氯苯氧乙酸), IBA (吲哚-3-丁酸) 和 K (激动素)。所有的激素都是商业产品, P(N-苯基-N'-(4-吡啶)尿) 是日本东京大学的 T. Okamoto 教授所提供。全部试剂直接在培养基里溶解, 然后在 121℃ 下灭菌 15 分钟。

细胞系的选择

本文所有的细胞系都选自需要 2,4-D 的愈伤组织。需要 2,4-D 的愈伤组织用 K1 (1ppm 激动素) 继代培养, 但不加 2,4-D, 用暖白色荧光照光 (2500~4000lux, 每天 16 小时)。此 K1 愈伤组织逐渐地生出幼根和芽。幼根在黑暗中用 IBA1 (1ppm IBA) 代替 K1 继代培养, 不久就能分化出根 (IBA1 愈伤组织)。

此两个细胞系 (1~2克) 移至装有 40ml 培养基的 Erlenmeyer 瓶中进行静态继代培养, 3~4 周为一个继代周期。

生长研究

将 1~2 克的愈伤组织移至装有试验琼脂培养基的三角瓶中。4 周后, 测定 10~12 瓶中愈伤组织的平均鲜重。在悬浮培养中, 往复式振荡培养是将 15 克的愈伤组织移至含有 250ml 的试验培养基的 1 升容积的 Erlenmeyer 瓶中振荡培养, 而旋转式振荡培养则将 30 克的愈伤组织移至含有 500ml 培养基的类似的三角瓶中旋转培养。4 周后, 测定 4 个三角瓶中愈伤组织的平均鲜重。50 克的这些愈伤组织用甲醇提取后, 剩下的材料在 80℃ 以上干燥并称重, 所有的试验重复 2~3 次。

皂甙的分离

从人参愈伤组织中分离皂甙在以前的论文中已有详细的报导*。

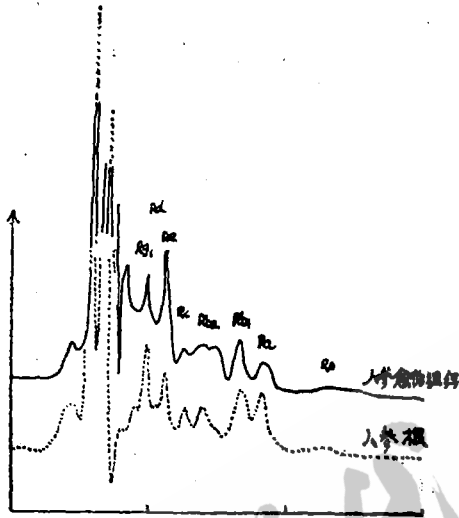
皂甙的高效液相层析

使用 Waters HPLC 仪器 (型号 ALC/GPC 244)。Shodex OH Pak-804; 柱 0.8×50cm; CH₃CN-H₂O (85:15); 流速 1.5 毫升/分; 图

* Furuya, T., et al: planta med., in press (1983)
* Furuya, T., et al: Chem. Pharm. Bull. 21,98 (1973)

速 0.25 厘米/分; 压力 20 公斤/厘米³; 检测器 RI; Rt = 人参皂甙 R₂₁, 19.8, Re 22.4, Rb₁ 33.8, Ra 36.4, Ro 47.2 分钟。

图 1 示用纯品皂甙进行比较而加以鉴定。



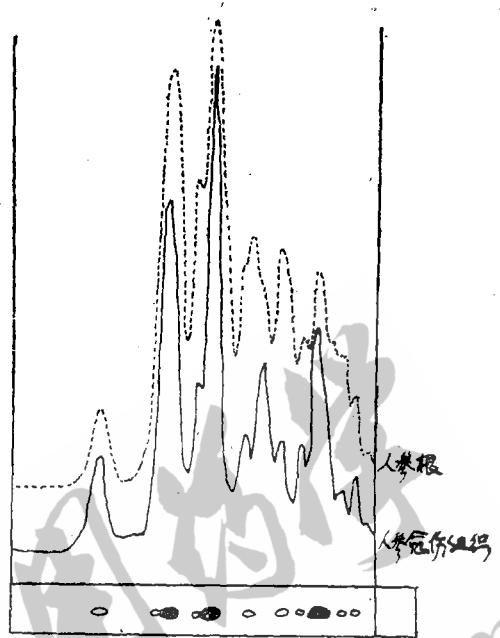
注射 洗脱时间(分钟)

图 1 人参根和愈伤组织中天然皂甙的高压液层

皂甙的测定

根据参考文献[1], 从用 K1 和 IBA1 法的愈伤组织中所获得的皂甙粗品与人参皂甙 Rb₁ 和 Rg₁ 的标准品一起在 Merck 硅胶薄层板 60F 254 上点样, 然后用正丁醇-乙酸乙酯-水(4:1:5)的上层液展开。皂甙的斑点用 10% 的 H₂SO₄ 喷雾检出, 随后在 105℃ 加热 10 分钟, 用津岛双波长薄层扫描仪, 型号为 CS-910, 波长为 λ₁ 530nm 和 λ₂ 700nm 进行光密度测定, 结果图 2 所示:

Rf 值: 人参皂甙 R₀ 0.04, Ra 0.08, Rb₁ 0.15, Rb₂ 0.19, Rc 0.25, Rd 0.34, Re 0.41, Rf 0.44, Rg₁ 0.50, Rg₂ 0.52, Rh 0.64。Rb 组的量是以人参皂甙 Ra, Rb₁, Rb₂, Rc 和 Rd 的总量而计算的, 都由原人参萜三醇作为皂甙元, Rg 组是以人参皂甙 Re, Rf, Rg₂ 和 Rh 的总量计算的, 都由原人参萜三



人参皂甙 Rb₁, Rg₂, Rg₁, Rf, Re, Rd, Rc, Rb₂, Rb₁, Ra, Ro 开始

图 2 人参根和愈伤组织中天然皂甙的薄层层析和双波长光谱醇作为皂甙元。

每一培养的皂甙总量可由薄层层析光密度测定法以测定纯人参皂甙的含量。本试验所示的所有数据是每 2 或 3 个不同培养的平均值, 在 IBA 系列中是 5 个培养的平均值。

结 果

皂甙的分析

根据参考文献[4], 从需要 2, 4-D 的愈伤组织(10 公斤鲜重)的甲醇提取物中分离得到的正丁醇可溶层蒸发后获得皂甙粗品。用氯仿-甲醇(1:2)在 Sephadex LH-20 柱上进行分离, 然后再利用氯仿-甲醇在硅胶层析柱上提纯。从每一部分中分离得到人参皂甙 Rg₁, Rc, Rb₁ 和 R₀ 的产量分别为 1750mg, 220mg, 295mg 和 260mg。分离所得的人参皂甙 Rg₁ 为醋酸盐, 呈无色小叶状, mp 242.5~243°, Rb₁ 是白色粉末, mp 197~198°, Re 是无色的针晶, 用 50% 甲醇结晶, mp 201

表2 K1愈伤组织的静态培养下光照对其生长和皂甙含量的影响

培养基	生长率	100克鲜重的干重	100克鲜重的皂甙含量(mg)			Rb组
			Rb组	Rg组	总量	Rg组
黑暗						
1ppmK	3.32	2.13	23.9	10.8	34.7	2.21
5ppmK	1.50	2.09	22.8	11.5	34.1	1.97
1ppmP	3.70	2.71	22.3	21.6	43.9	1.03
5ppmP	4.17	2.19	31.2	21.9	53.1	1.42
1ppmIBA	2.75	2.98	26.0	28.4	52.4	0.98
5ppmIBA	2.95	2.70	21.4	12.7	34.1	1.69
光照						
1ppmK	3.70	2.40	27.5	17.6	45.3	1.54
5ppmK	1.97	2.25	24.5	19.5	43.0	1.32
1ppmP	4.23	2.98	14.9	22.2	37.1	0.67
5ppmP	4.51	2.18	15.3	14.0	29.3	1.09
1ppmIBA	3.20	2.79	30.6	12.5	43.1	2.45
5ppmIBA	3.87	2.59	30.3	10.2	40.5	2.97

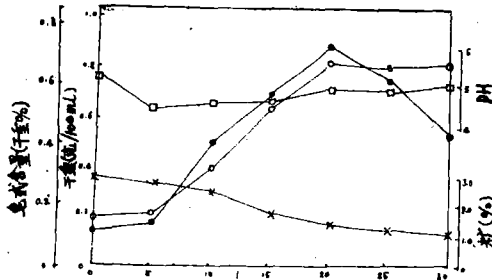


图3 人参愈伤组织中皂甙含量, 生长, pH和糖消耗的变化

○—○生长 ●—●皂甙含量
□—□pH变化 ×—×糖消耗

表1 IBA1愈伤组织的静态培养中植物生长调节剂对皂甙含量及生长的影响

培养基	生长率	每100克鲜重的干重(克)	每100克鲜重的皂甙含量(毫克)			Rb组
			Rb组	Rg组	总量	Rg组
IAA1	2.68	3.85	19.0	27.7	46.7	0.69
IAA1K0.1	3.04	3.87	19.6	17.4	37.0	1.13
IAA5	3.43	3.71	13.1	12.3	25.9	1.02
IAA5K0.1	3.67	3.80	17.6	29.4	47.0	0.60
NAA1	2.98	3.48	23.7	19.1	42.8	1.24
NAA1K0.1	2.52	3.40	20.5	18.6	39.1	1.10
NAA5	3.22	3.32	21.7	17.0	38.7	1.28
NAA5K0.1	3.36	3.16	21.8	15.3	37.1	1.42
2,4-D1	2.69	3.40	21.4	19.9	41.3	1.08
2,4-D1K0.1	2.88	2.02	44.2	14.4	58.6	3.07
IBA1	3.40	2.80	22.0	19.8	41.8	1.11
IBA1K0.1	3.62	3.00	15.6	15.1	30.7	1.03
IBA5	3.61	2.80	14.2	9.4	23.6	1.51
IBA5K0.1	3.18	2.60	31.2	25.6	56.8	1.22
IBA1K1	4.33	2.60	22.6	16.4	39.0	1.38
IBA1K5	3.89	2.00	16.8	13.2	30.0	1.27
IBA1K0.1	3.22	4.76	23.1	18.9	42.0	1.22
IBA5K1	5.14	3.04	6.2	11.4	17.6	0.51
K1	4.34	2.60	24.4	26.3	50.7	0.93
K5	3.93	2.61	15.6	11.4	27.0	1.37
P1	4.80	3.03	15.7	13.9	29.6	1.13

注: 培养基项中的数字为ppm IAA-吲哚乙酸 NAA-奈乙酸 2,4-D-2,4-二氯苯氧乙酸 IBA-吲哚丁酸 K-激动素 P-N-苯基-N'-(4-吡啶)尿 Rb组指人参皂甙Ra、Rb₁、Rb₂、Rc和Rd, 以原人参甙二醇为皂甙元, Rg组包括人参皂甙Re、Rf、Rg₁、Rg₂和Rh, 以原人参甙三醇为皂甙元。

~203°, R₀用甲醇重结晶得无色针晶, mp 239~241°, 经用熔点、红外光谱、核磁共振和质谱与纯品人参皂甙比较, 确定了4种人参皂甙, 并且首次在人参愈伤组织中分离到人参皂甙Re和R₀。此外, 所有人参皂甙R₀、Ra、Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₁、Rg₂和Rh的存在是通过薄层层析及高效液相层析检测的, 并由光密度法加以测定。

人参愈伤组织中皂甙含量的变化

在需要2,4-D的愈伤组织继代培养中, 生长和皂甙含量、pH、糖含量等的变化的时间进程如图3所示。

培养基的pH大致从4.0改变至6.0, 愈伤组织的生长稍稍增加。皂甙含量以干重计算在0.15~0.9%之间波动, 而与愈伤组织平行其最大值在培养20天时。

静态培养中植物生长调节剂和光对皂甙含量的影响

已测定了用IBA1愈伤组织在静态培养中生长素和细胞分裂素对皂甙含量的影响。联合应用IBA和K时可观察到较好的生长率和较高的皂甙量, 如表1所示。2,4-D显示

对需要2,4-D的愈伤组织产生最好的生长,但抑制IBA1愈伤组织的生长,5ppm的2,4-D使其生长完全停止。

2500~4000lux的光照对K1愈伤组织的生长和皂甙含量的影响见表2。K1愈伤组织在光照下产生芽。

在光照下使用P(N-苯基-N'(4-吡啶))

尿生长率最高,但皂甙含量最低。这是由于Rb组皂甙量的减少之故。

悬浮培养法中各种培养条件对皂甙含量及生长的影响

悬浮培养的各种条件,对IBA1愈伤组织在黑暗条件下产生幼根的皂甙含量及生长方面作了比较。综合其结果于表3。

表3 IBA1愈伤组织的悬浮培养法中,不同振荡方法对皂甙含量和生长的影响

培养基	生长率	每100克鲜重的皂甙含量(mg)			Rb组		培养基	生长率	每100克鲜重的皂甙含量(mg)			Rb组	
		Rb组	Rg组	总量	Rg组	Rb组			Rg组	总量	Rg组		
往复振荡							旋转振荡						
IAA1	2.38	3.98	23.4	56.3	79.7	0.42	IAA1	3.74	3.41	20.4	34.7	55.1	0.59
IAA2	2.54	4.12	23.7	56.4	80.1	0.42	IAA2	4.41	3.93	14.9	22.0	36.9	0.68
IAA5	2.41	4.08	16.2	52.0	68.2	0.31	IAA5	4.12	39.0	7.6	9.5	17.1	0.80
IAA1K0.1	3.01	4.19	9.8	18.4	28.2	0.53	IAA1K0.1	4.35	3.73	23.8	17.6	41.4	1.35
IAA2K0.1	3.23	4.27	22.1	31.5	53.6	0.70	IAA2K0.1	5.73	3.52	24.3	21.8	46.1	1.11
IAA5K0.1	3.09	4.12	17.7	29.5	47.2	0.60	IAA5K0.1	4.12	4.05	24.4	17.9	42.3	1.36
NAA1	2.69	4.15	32.0	28.2	60.2	1.13	NAA1	4.68	3.70	19.3	19.5	38.8	0.99
NAA2	3.88	4.03	31.3	33.0	64.3	0.95	NAA2	4.36	3.75	22.0	20.8	42.8	1.06
NAA5	3.95	3.92	30.9	27.8	58.7	1.11	NAA5	5.83	3.57	17.5	19.9	37.4	0.88
NAA1K0.1	3.71	4.62	22.8	15.7	38.5	1.45	NAA1K0.1	4.31	3.55	19.2	18.6	37.8	1.03
NAA2K0.1	4.20	4.36	22.9	16.0	38.9	1.43	NAA2K0.1	4.89	3.72	23.3	13.9	37.2	1.68
NAA5K0.1	5.15	4.34	21.2	18.4	39.6	1.15	NAA5K0.1	5.26	3.60	20.9	13.3	34.2	1.57
2,4-D1	2.85	3.90	24.0	4.4	38.4	1.67	2,4-D1	3.41	3.44	21.4	11.7	33.1	1.83
2,4-D2	2.54	3.94	22.8	13.5	36.3	1.69	2,4-D2	2.06	3.72	22.2	13.0	35.2	1.71
2,4-D5	1.82	3.78	19.6	12.4	32.0	1.58	2,4-D5	1.75	3.82	21.0	14.3	35.3	1.47
2,4-D1K0.1	2.99	3.50	11.0	8.2	19.2	1.34	2,4-D1K0.1	3.47	2.92	21.0	23.1	44.1	0.91
2,4-D2K0.1	2.28	3.88	18.8	11.9	30.7	1.58	2,4-D2K0.1	2.23	3.56	23.5	20.5	44.0	1.15
2,4-D5K0.1	1.96	3.32	12.4	14.1	26.5	0.88	2,4-D5K0.1	1.57	3.74	20.9	11.7	32.6	1.79
IBA1	2.58	4.90	23.1	65.4	88.5	0.35	IBA1	4.11	4.15	18.1	38.7	56.8	0.47
IBA2	2.86	5.04	26.3	82.8	109.1	0.32	IBA2	4.80	4.42	16.5	42.0	58.5	0.39
IBA5	2.84	4.51	21.0	53.8	74.8	0.39	IBA5	3.42	4.32	26.2	43.1	69.3	0.61
IBA1K0.1	2.86	4.79	36.3	21.5	57.8	1.69	IBA1K0.1	3.17	4.95	33.7	47.3	81.0	0.71
IBA2K0.1	3.00	5.16	24.3	21.2	45.5	1.15	IBA2K0.1	4.66	5.95	32.8	44.2	77.0	0.74
IBA5K0.1	2.92	4.11	20.9	21.1	42.0	0.99	IBA5K0.1	4.14	4.11	16.3	41.8	58.1	0.39
IBA1P0.1	5.08	3.99	12.0	15.7	27.7	0.76	IBA1P0.1	5.48	3.38	19.1	18.8	35.9	1.14
IBA2P0.1	4.92	4.12	13.5	13.8	27.3	0.96	IBA2P0.1	6.34	3.59	22.3	16.5	38.8	1.35
IBA5P0.1	5.30	4.06	7.7	6.3	14.0	1.22	IBA5P0.1	8.19	3.44	25.3	17.0	42.3	1.49
							人参(天然的)		16.15	45.8	40.1	85.9	1.14
							人参(侧根)		15.45	46.7	32.6	79.3	1.43

旋转振荡培养与往复振荡培养相比,其生长是非常好,特别在使用IBA时,但皂甙产量则以往复振荡培养为高,2,4-D存在时

则为例外。已观察到IEA与K的配合使用比IBA与P的配合在生长率上较低,但皂甙产量要高得多,即IBA2与K0.1联用,获得

最好的产量指数(可用生长和皂甙产量的函数表示), IBA5 与 P0.1 配合使用则得到最佳的生长速率 8.19。

试验表明旋转悬浮培养法与往复振荡培养法相比, 产生许多会生出众多幼根的柔软的褐色细胞团, 其生长率前者为后者的 1.8 倍。同时, 皂甙产量指数要高。细胞悬浮培养也较静态培养在皂甙产量上要高。而静态培养中的光照和黑暗条件之间, 对于皂甙产量和生长, 没有差别。朝鲜栽培的 5 年生人参参与愈伤组织培养的比较列于表 3 的最后一行。愈伤组织最好的培养条件是 IBA2 和 K0.1 联用, 产生的皂甙产量, 特别是原人参萜三醇组皂甙与生药几乎相同, 而 Rb₁ 的含量则高于生药人参, 不过 Rc 和 Rd 则低于后者。

讨 论

众所周知, 在植物细胞悬浮培养中, 能有效地大量产生像蒽醌、萘醌及苯醌等二次代谢产物, 并已经在大规模的烟草悬浮培养中获得成功。

在本文中, 通过选择获得的两个细胞系,

被用来在振荡瓶中研究群体悬浮培养。已证明, 2,4-D 愈伤组织在旋转振荡培养中, 其生长率增加了 6~8 倍, 皂甙含量增加了 5—10 倍, 旋转振荡培养的生产指数是最高的。由旋转振荡培养所获得的幼根是直的, 而由往复振荡培养所获得幼根是球形的。也已搞清楚, 在有些细胞系中, 其皂甙的种类和含量与栽培人参根几乎相同。在 IBA2 K0.1 的往复振荡培养中, 纯皂甙的含量最高值为鲜重的 0.11%, 干重的 2.16%, 在 IBA2 的旋转振荡培养中, 最高的生产指数是鲜重的 0.08%, 干重的 1.29%, 而天然人参根则为鲜重 0.09%, 干重 0.53%。

必须研究振荡瓶中如通气与振荡等各种培养条件的影响。但已有人建议: 在最近的将来会采用悬浮培养法如发酵罐来提供与栽培人参根相同的人参粉末和如人参皂甙 Rg₁, Rb₁ 这样的有效成份。

《Planta Medica》Vol. 48, P.

83—87, 1983, 孙昌高译,

孙廷辉校)