

西洋参细胞悬浮培养中的化学调节

方绮民 郑光植 王世林

(云南师大生物系) (中国科学院昆明植物研究所)

摘 要 对西洋参悬浮培养细胞的生长, 各种生长素 (2,4-D, NAA, IBA 和 TAL) 中以 2,4-D、IBA 和 TAL 较好, 二种细胞分裂素 (KT、BA) 中以 BA 较好。对西洋参悬浮培养细胞中粗皂甙含量, 当 IBA 浓度在 3.5mg/L 以下时, 粗皂甙含量随 IBA 浓度的增加而增加, IBA 的较适浓度为 3.5mg/L。在 2,4-D、BA、IBA、TAL、NAA 和 KT 的组合试验中, 以 2,4-D 0.5、IBA 3.5、BA 0.5(mg/L) 的组合对生长最好, 其次是 KT 0.1、2,4-D 0.5 (mg/L) 的组合, 适量的 LH 和 CM 均促进细胞生长, 硝态氮有利细胞生长, 而铵态氮则有利皂甙的产生。将培养基中蔗糖用量由 2.5% 降到 1.5% 时, 人参皂甙产率由 39.4mg/L 增至 138.4mg/L。糖的使用方式对于生长也很重要。

关键词 西洋参 细胞悬浮培养 皂甙 植物激素 氮源 碳源

西洋参与人参同属五茄科人参属植物, 是一种药用价值与人参相似的名贵药材, 与人参相比人们更喜用西洋参, 因其性较温和, 具有滋补、强心、造血、健胃、镇静和降血脂等医疗作用。西洋参的主要药用成分是人参皂甙, 其中皂甙 Rg1 具抑制癌细胞的作用^[1]。由于野生或栽培西洋参对土壤、气候等等条件要求严格, 生长缓慢, 一般需四至六年才能收获入药, 使得供不应求且价格昂贵, 因而研究西洋参的细胞工程学是有意义的。人们已能成功地利用植物细胞工程进行有用次级代谢物的工业化生产^[2]。在植物细胞工程学的研究中, 细胞悬浮培养是一个重要环节, 是过渡到工业生产的关键。Kim 等、Thang 等、朱蔚华^[3]等分别进行过西洋参愈伤组织培养, Thang 等^[4]进行了西洋参细胞悬浮培养, 郑光植等^[5]进行了恒洋参、人参和三七悬浮培养细胞的比较研究。本文是在郑光植对西洋参组织培养研究的基础上, 进行西洋参悬浮培养的调节, 通过调节促进培养细胞的生长, 提高人参皂甙的含量。

1 材料和方法

1.1 培养方法

采用人工栽培西洋参根愈伤组织作“接种子”, 以 MS^[6]加 2,4-D 0.25、KT 0.08 (mg/L) (激素试验除外)、CM 10% 为基本培养基进行悬浮培养。培养用 250ml 锥形瓶, 内装 50ml 培养液 (PH 5.8), 高压灭菌 (121℃、15 分钟), 接种愈伤组织于瓶中, 置于旋转式摇床 (自制) 上培养, 摇床转速 150 转/分, 培养温度 26±0.5℃, 暗培养。

1.2 测定方法

生长测定方法: 将培养物过滤, 收集培养物于称量瓶中称鲜重后, 再将培养物连同称量瓶放入烘箱在 60℃ 下烘烤二十四小时, 最后称干重。

人参皂甙测定方法参考 Furuya^[6]使用方法加以改进. 测定作用干样品. 碾细样品, 按 1 克干样品加 50ml 正丁醇的比例加入正丁醇, 冷浸两天后用超声波处理十分钟, 过滤. 滤液加水洗三次. 得到的粗皂甙用 4N-HCl (50% 溶液) 在 75℃ 下恒温静置水解 2 个半小时, 水解液用乙醚提取三次. 提取液过中性氧化铝柱层析, 用 C₆H₆/EtoAc (85:15) 洗脱 30ml. 其它步骤参见 Furuya 等法.

每次试验至少重复三次.

注: 文中中缩写符号意思如下:

2,4-D 为 2,4-二氯苯氧乙酸; NAA 为萘乙酸; IBA 为吲哚丁酸, TAL 为三十烷醇; KT 为细胞分裂素; BA 为苄基嘌呤; CM 为椰乳; LH 为水解乳蛋白.

2 结果与讨论

2.1 添加剂对西洋参悬浮培养细胞生长的影响

西洋参悬浮培养细胞在整个试验开始阶段生长极慢. 为了提高其生长, 在培养液中添加不同浓度的椰乳和水解乳蛋白. 结果可从表 1 得知:

表 1 各种添加剂对悬浮培养细胞生长的影响

Tabl. Effects of several additives on growth of suspension culture cells

添加剂 Additive concent. (%)	生长速率 Growth rate (mg. D. W. L / day)	干重 Dry weight ht (g / L)	添加剂 Additive concent. (g / L)	生长速率 Growth rate (mg D.W. / L / day)	干重 Dry weight (g / L)
CM 10	36.5	1.24	LH 0.25	36.8	1.25
CM 20	44.9	1.35	LH 0.50	43.3	1.30
CM 30	37.0	1.24	LH 2.50	29.3	0.88
Control 0	6.6	0.20	Control 0	—	—

在一定浓度范围内, 这二种添加剂均能促进西洋参悬浮培养细胞的生长. 椰乳较适浓度为 20%, 水解乳蛋白较适浓度为 0.5g / L.

2.2 激素调节

使用二类大种植物激素进行调节. 首先比较植物生长素类的四种激素对西洋参悬浮培养细胞生长的影响情况 (图 1). 可以看出 NAA、2,4-D、IBA、TAL 各自作用效果不同: 有的有利于生长, 而有的则有抑制生长. 2,4-D 对生长最为有利, 其较适浓度为 0.5mg / L; TAL 和 IBA 的作用次于 2,4-D 但比 NAA 好, NAA 则不利生长.

图 2 表明两种细胞分裂素对西洋参悬浮培养细胞生长的作用情况. BA 与 KT 相比, BA 对培养细胞较为有利, BA 较适浓度为 0.5mg / L.

植物激素不仅影响西洋参悬浮培养细胞的生长, 而且影响培养细胞中人参皂甙含量. 图 3 表明当 IBA 的浓度在 3.5mg / L 以下时, 培养细胞中人参皂甙含量随着 IBA 的浓度的增加而增加, IBA 较适浓度为 3.5mg / L, 高于或低于此浓度其人参皂甙含量都会降低.

除试验各种激素单独作用的效果外,还选用五种激素按各自单独作用的较适浓度组合试验,结果见表2: BA0.5 (mg/L) 分别与 IBA3.5、NAA0.25、2,2,4-D 0.5 及 TAL3.5 (mg/L) 组合,四个组合均使西洋参悬浮培养细胞的生长低于对照;而 BA0.5 与 IBA3.5、2,4-D0.5 (mg/L) 三种激素组合,则使培养细胞的生长略高于对照.对培养细胞的生长而言,以 BA0.5、2,4-D0.5、IBA3.5 (mg/L) 组合最好,其次是 KT0.1、2,4-D0.5 (mg/L) 的组合.

因此,作用的激素种类、浓度及其适宜浓度的各种激素组合对西洋参悬浮培养细胞的生长和人参皂甙含量都是很重要的影响因素.

2.3 氮源调节

Furuya 等^[7]在参发酵培养中发现,改变 MS^[6]培养基中氮的源的种类以及氮源的数量更有利于人参培养细胞的生长.

为了提高恒洋参悬浮培养细胞的生长及人参皂甙含量,对其进行氮源调节,试验培养细

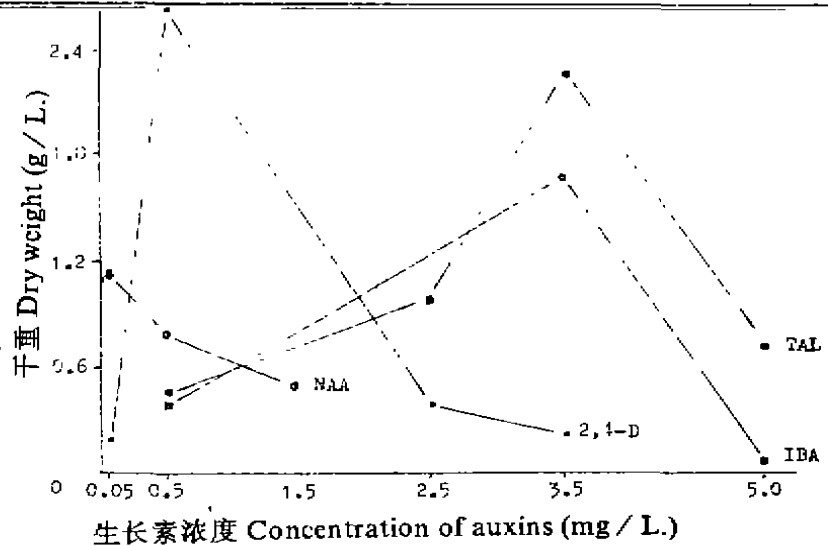


图1 各种生长素对西洋参悬浮培养细胞生长的影响

Fig. 1. Effects of several auxins on growth of suspension culture cells of *P. quinquefolium*

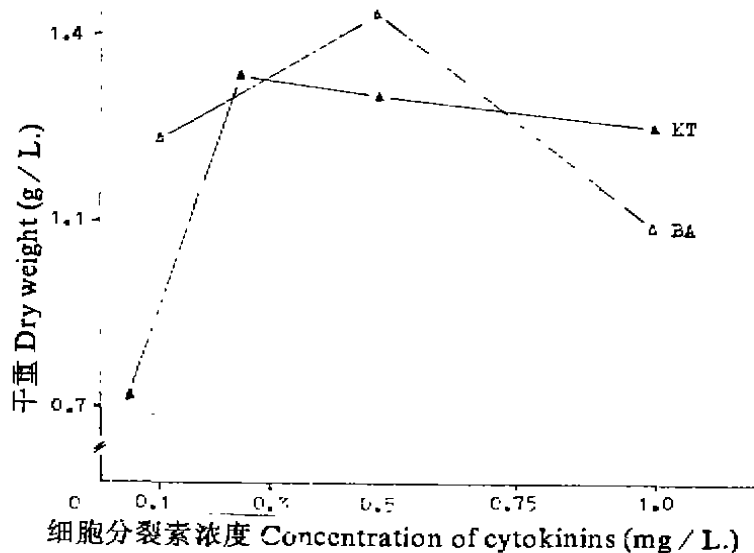


图2 各种细胞分裂素对西洋参悬浮培养细胞生长的影响
Fig. 2. Effects of several cytokinins on growth of suspension culture cells of *P. quinquefolium*

胞对硝态氮和铵态氮及其不同浓度的影响,得出如表3所示结果:西洋参悬浮培养细胞对于硝态氮和铵态氮的选择性不强,而对氮源浓度变化比较敏感.使用 KNO_3 或 NH_4NO_3 对于培养细胞生长的影响无明显差异,氮量不足或过多都使培养细胞的生长降低. NH_4^+ 比 NO_3^- 有利于培养细胞中人参皂甙含量的提高.

试验结果表明无论对西洋参悬浮培养细胞的生长,还是对其人参皂甙含量而言,MS培养基中氮量偏多,需加以调节.综合生长及含量的情况以使用 NH_4NO_3 1650mg/L为宜.

2.4 碳源调节

培养基中糖是碳源的主要来源,是构成培养基的一个重要组分.因此,调节培养基中糖的种类、浓度和作用方式,从而调节碳源.这对西洋参悬浮培养细胞的生长,及其人参皂甙含量的提高很有必要.

试验比较了五种浓度的蔗糖或葡萄糖的影响,结果列于表4.

表2 各种植物激素组合对悬浮培养细胞生长的影响

Table2. Effects of several phytohormone combinations on growth of suspension culture cells

激素组合 combinations of hormone (mg/L.)	生长速率 Growth rate (mgD.W./L./day)	干重 Dry weight (g/L.)
2,4-D 0.5+BA 0.5	42.1	1.26
IBA 3.5+BA 0.5	27.5	0.82
TAL 3.5+BA 0.5	29.6	0.89
NAA 0.25+BA 0.5	31.1	0.93
2,4-D 0.5+IBA 3.5+BA 0.5	83.4	2.50
2,4-D 0.25+KT 0.1(CK)	82.3	2.47

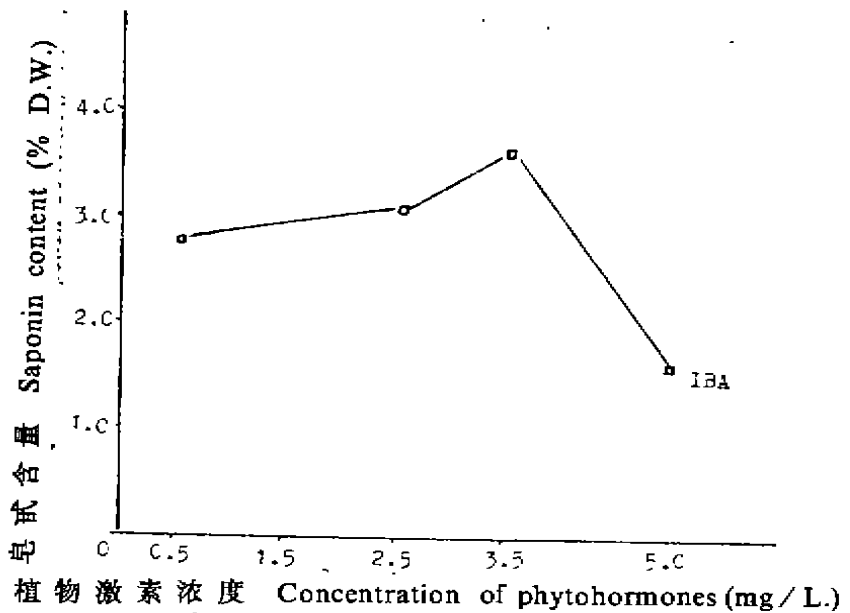


图3 植物激素浓度对西洋参悬浮培养细胞中皂甙含量的影响

Fig. 2. Effects of phytohormone concentrations on saponin content in the suspension culture cells of *P. quinquefolium*

表3 氮源对悬浮培养细胞生长和皂甙含量的影响

Table 3. Effects of nitrogen resource on growth and saponin content of suspension culture cells

硝酸钾 KNO ₃ (mg/L)	硝酸铵 NH ₄ NO ₃ (mg/L)	生长速率 Growth rate (mg D.W./L/day)	干重 Dry Weight (g/L)	皂甙含量 Saponin content (% D.W.)	皂甙产率 Saponin yield (mg/L)
500	0	56.7	1.93	2.0	39.1
1900	0	81.1	2.76	2.7	75.2
4000	0	60.7	2.06	2.6	52.6
0	1650	70.0	2.38	3.3	79.3
1650	1900(CK)	60.2	2.05	2.3	46.7

就生长而言, 无论使用蔗糖或葡萄糖过低过高的糖量, 均不利于西洋参悬浮培养细胞的生长, 尤其过高(如 2.5%) 的糖量更为明显. 在使用相同糖量的情况下, 蔗糖比葡萄糖更有利于生长. 蔗糖的最适生长浓度为 1.5%.

蔗糖和葡萄糖相比, 二种糖对培养细胞中人参皂甙含量的影响差异不大. 培养细胞中人参皂甙含量对糖的浓度比较敏感. 当蔗糖浓度为 2.5% 或葡萄糖浓度 1.0% 时, 培养细胞的人参皂甙含量较高.

综合生长和人参皂甙含量来看, 培养中使用蔗糖比较有利于皂甙产率的提高. 经过调节得知当培养基中蔗糖浓度从 2.5% 降至 1.5% 时, 其人参皂甙产率由 39.4 提高到 138.2mg/L.

除糖的种类和数量外, 糖的作用方式也是很重要的一个方面. 从表 5 是知, 相同种类

表4 碳源对悬浮培养细胞生长和皂甙含量的影响

Table 4. Effects of carbon resource on growth and saponin content of suspension culture cells

碳源浓度 Carbon resource concentration (%)	生长速率 Growth rate (mg D.W./ L/day)	干重 Dry weight (g/L)	皂甙含量 Saponin content (% D.W.)	皂甙产率 Saponin yield (mg/L)
蔗糖				
Sucrose 0.5	35.4	1.20	2.5	29.5
Sucrose 1.0	53.9	1.83	4.3	79.3
Sucrose 1.5	86.5	2.94	4.7	138.2
Sucrose 2.0	35.6	1.21	3.8	45.6
Sucrose 2.5	20.7	0.70	5.9	39.4
葡萄糖				
Glucose 0.5	29.8	1.01	5.2	53.1
Glucose 1.0	42.1	1.41	5.6	83.3
Glucose 1.5	25.4	0.86	4.5	39.2
Glucose 2.0	22.2	0.76	3.7	29.7
Glucose 2.5	7.7	0.26	5.5	16.4

相同浓度的糖在培养一开始全部加入,或者培养一开始加入总量的一半,培养二周后再加入另一半,这二种使用方式对西洋参悬浮培养细胞的皂甙产率的影响是不同的.后一种使用方式更有利于皂甙产率的提高.

表 5 蔗糖和葡萄糖使用方法对悬浮培养细胞的影响

Table 5. Effects of using method of sucrose and glucose on suspension culture cells

培养开始加入 Addition at cultuer start (%)	培养 2 周后加入 Addition af- ter 2 weeks cultuer (%)	生长速率 Growth rate (mh D.W. / L. / day)	干重 Dry Weight (g / L.)	皂甙含量 Saponin content (% D.W.)	皂甙产率 Saponin yield (mg / L.)
蔗糖 Sucrose 1.5	Sucrose 1.5	120.9	4.11	2.5	100.7
Sucrose 3.0	-	96.1	3.27	2.0	65.3
Suc1.5+Glu.1.0	-	48.2	1.64	3.1	50.5
葡萄糖 Glucose 1.0	Sucrose 1.5	81.1	2.75	2.8	76.1

糖的使用方式不同主要是影响培养细胞的生长.其原因可能是培养一开始糖量偏高反而抑制生长,随着培养时间的延长糖被逐渐消耗;此时,补充一定量的糖有利于生长.

总之,通过西洋参悬浮培养细胞的化学调节,使培养细胞的生长速率由 6.6 mg D.W / L.Day 提高至 120.9 mg D.W / L.Day,从而达到提高生长的目的.

参 考 文 献

- 1 熊谷郎、大浦彦吉、奥田拓道编,草用人参'85,共立出版株式会社,日本,1985;PP.71-83.
- 2 郑光植,植物次级代谢物细胞工程研究的新进展.植物生理学通讯,1987;2:76-80.
- 3 朱慰华、地新兰,西洋参组织培养初报.中草药,1980;11(10):471-72.
- 4 Jhang, J. J., E. J. Staba and J. Kim, American and Korean ginseng tissue cultures: growth, chemical analysis and plantlet production. In vitro, 1974;9(4): 253-59.
- 5 Zheng, G. Z., S. L. Wang and F. Y. Gan, Studies on cell technology of secondary metabolites from *Panax notoginseng*. Proceedings of China -Japan symposium on Plant Biotechnology, shanghai, China, 1988;PP. 26-30.
- 6 Murashige, T. and F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 1962;15(3):473-97.
- 8 Furuya, T., Yoshikawa, T., Ishii, T. and Kajii, K. Regulation of saponin production in callus cultures of *Panax ginseng*, *Planta Med.*, 1983;47:200-204.

CHEMICAL REGULATION OF CELL SUSPENSION CULTURE OF PANAX QUINQUEFOLIUM

Fang Qimin, Zheng Guangzhi and wang Shilin

(Kunmign Institute of Botany, Academia Sinica)

ABSTRACT A series of chemical factors affecting the growth and the saponin content of *Panax quinquefolium* cultured cells in a suspension medium were trialed in this study. The results showed that, for the growth of cells, the effects of some auxins like 2,4-D, IBA and TAL were more efficient than that of NAA. While between two phttokinins, BA was better than KT. As for the total saponin content of cultured cells, it was increased as the increase of IBA with its concentration by 3.5 mg/L in the medium. The optimum concentration of IBA was 3.5 mg/L. In a trial with comopound factors, the cell growth was best in the treatment of 2,4-D 0.5 + IBA 3.5 + BA 0.5 (mg/L), followed by the treatment of 2,4-D 0.5 + KT 0.1 (mg/L). Using appropriate amount of LH and CM could stimulate the cell growth, As to the nitrogen source $\text{NO}_3\text{-N}$ was more beneficial for the cell growth than $\text{NH}_4\text{-N}$, though the latter was advantageous to the saponin yield. When the sucrose concentration was reduced in the medium from 2.5% to 1.5%, the saponin yield was increased from 39.4 mg/L to 138.4 mg/L. for the cell growth, using method of sucrose and glucose was importnt.

KEY WORDS *Panax quinquefolium* Cell suspension culture Saponin Phttohormones nitrogen source Carbon source.