

西洋参细胞悬浮培养中皂甙生物合成的代谢调节

方绮民 郑光植 周立刚

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明)

七种真菌菌丝体诱导因子中,六种促进培养细胞的皂甙生物合成,尤其葡枝根霉作用更为明显,提高皂甙含量二倍。人参寡糖素是一种既能诱导皂甙生物合成,又能促进细胞生长的新型诱导因子,浓度为50mg/L寡糖素既能维持细胞较好生长又能提高皂甙含量,因而得到较高的皂甙产率。用四种条件培养液进行培养,结果均促进悬浮培养细胞的皂甙生物合成,其中丹参条件培养液使悬浮培养细胞的皂甙含量提高二倍多。加入皂甙生物合成主途径的三种前体,都不同程度地促进皂甙的生物合成,前体中以角鲨烯作用最为明显。

关键词 西洋参; 皂甙; 悬浮培养; 条件培养; 寡糖素; 菌丝体; 前体

西洋参(*Panax quinquefolium*)与人参(*P. ginseng*)、三七(*P. notoginseng*)同属五加科(Araliaceae)人参属的贵药材,具有滋补、强心、镇静、健胃、造血和降血脂等医疗作用。其有效成分主要为皂甙,且尚未人工合成。栽培需5—6年才能入药,产品供不应求,价格昂贵。西洋参细胞悬浮培养是其细胞大量培养应用于工业化生产的重要环节,国外仅有零星报道^[1],国内除本实验室^[2,3,4]外尚未见报道。本文是在过去研究的基础上,在西洋参细胞悬浮培养中,应用人参寡糖素、真菌菌丝体、条件培养、前体对皂甙生物合成和细胞生长调节的研究。

材料和方法

(一)实验材料

以继代培养七代以上的愈伤组织无性系为实验材料。暗培养于1L培养基中补充2,4-D 0.5mg、KT0.1mg、椰乳100ml的MS^[5]培养液(pH5.8, 121℃ 15min高压灭菌)中。每250ml三角瓶内装50ml培养

液。接种愈伤组织后置于转速为150rpm、振幅2.5cm的旋转式摇床上,于26±1℃培养。

(二)生长速率、皂甙和植物甾醇含量测定

细胞生长速率按过去的方法^[2]测定。除没有特殊交待外,悬浮培养时间均为34天。

皂甙和植物甾醇含量测定方法参考Furuya等的方法^[6]并加以改进。改进之处是:测定用干样品,1g干样品加50ml正丁醇冷浸两天后用超声波(Soniprep 150型超声波仪,日本)处理10min,得到的粗皂甙用4N HCl在75℃下恒温静置水解2.5h,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。其它均同于Furuya等的方法^[6]。

数据均为三次以上重复实验的平均值。

(三)条件培养

本文于1991年1月30收到。

用红花(*Carthamus tinctorius*)、丹参(*Salvia yunnanensis*)、人参和西洋参四种愈伤组织分别培养在MS培养基中,每升培养基附加2,4-D 0.2mg、KT0.05mg,椰乳100ml。悬浮培养至各自对数生长前期,收获离心(3000rpm)后,采上清液为条件培养液,分别加入西洋参悬浮培养液对西洋参细胞进行条件培养。

(四)真菌菌丝体诱导

七种菌即尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)、大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)、密环真菌(*Armillaria mellea*)、葡枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)、根霉(*Rhizopus sp.*)、文氏曲霉(*Aspergillus sp.*)和烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)。分别接种于马铃薯培养液中,悬浮培养15天,收获过滤。将所得菌丝体用重蒸水洗3次,然后悬浮于重蒸水中匀浆。浆液高压灭菌(121℃,15min)。将2mg干菌丝体悬浮液加入50ml已培养24天的西洋参悬浮细胞中进行诱导,继续培养至34天,收获分析。

(五)前体

乙酸钠溶于水,牻牛儿醇和角鲨烯用重蒸馏水稀释。各前体均用细菌过滤器灭菌,在培养开始时加入培养液。

结 果 和 讨 论

(一)条件培养

选用四种条件培养液对西洋参悬浮细胞进行条件培养。结果如表1所示。六组条件培养液均不利于培养细胞的生长,但均促进培养细胞的皂甙合成。不同条件培养对西洋参悬浮培养细胞的影响也不同。红花条件培养液利于皂甙形成而不利于细胞生长,但随着时间的延长,对细胞生长的不利程度降低,因而使皂甙产率达最高

值。丹参条件培养液随着培养时间的延长,对细胞生长的不利程度并不随之变化,因而皂甙含量随之降低。六组条件培养液中培养六天的丹参培养液使悬浮培养细胞的皂甙含量达最高,其皂甙含量值为对照的三倍多。

表1 各种条件培养对西洋参悬浮细胞生长和皂甙含量的影响

Table 1 Effects of various conditional culture on growth and saponin content of suspension culture cells of *P. quinquefolium*

Conditional culture solution and its culture time (day)	Growth rate (mg dwt./L.d)	Dry weight (g/L)	Saponin content (%)	Saponin yield (mg/L)
<i>C. tinctorius</i> 12	109.4	3.72	1.7	63.2
<i>C. tinctorius</i> 6	48.9	1.66	1.8	30.0
<i>S. yunnanensis</i> 12	31.8	1.08	2.0	21.9
<i>S. yunnanensis</i> 6	31.9	1.08	3.5	37.5
<i>P. ginseng</i> 12	28.9	0.98	2.2	21.9
<i>P. quinquefolium</i> 12	36.2	1.23	3.4	41.9
Control 12	118.7	4.04	1.1	44.0

(二)真菌菌丝体诱导物

植物体中甾族类皂甙能抑制多种致病真菌的生长^[7,8],被称为“植物抗毒素”^[9]。植物甾族类皂甙作为对病原性真菌感染的反应在植物中积累^[10],病原性真菌作为一种“诱导物”能促进甾族类皂甙的合成。西洋参中的皂甙属于甾族类皂甙,本实验选用已灭活的真菌菌丝体作为“诱导物”对西洋参悬浮培养细胞进行诱导。试验结果(表2)表明,七种菌丝体中除根霉外,其余均不利于细胞的生长。除烟曲霉菌丝体外,其余六种能不同程度地诱导西洋参细胞的皂甙合成。葡枝根霉诱导细胞的皂甙形成,皂甙含量提高二倍,且不减慢培养细胞的生长,故皂甙产率最高。

表2 加入各种真菌菌丝体后悬浮培养细胞的生长和皂甙含量

Table 2 Growth and saponin content in suspension culture cells of *P.quinquefolium* after addition of various fungal mycelia

Fungal species	Growth rate (mg d.w./L.d)	Dry weight (g/L)	Saponin content (%)	Saponin yield (mg/L)
<i>Fusarium oxysporum</i>	63.7	2.16	5.6	120.1
<i>Verticillium dahliae</i>	44.6	1.52	2.9	43.8
<i>Armillaria mellea</i>	50.2	1.70	2.4	41.5
<i>Rhizopus stolonifer</i>	105.4	3.58	6.0	216.1
<i>Rhizopus sp.</i>	128.1	4.35	3.3	143.3
<i>Aspergillus fumigatus</i>	83.1	2.82	1.9	53.1
<i>Aspergillus sp.</i>	72.4	2.46	2.8	69.2
Control	105.7	3.59	2.0	71.9

(三) 人参寡糖素诱导子

我们发现从高等植物中分离到的寡糖

素能诱导三七、西洋参、红花、滇紫草(*Onosma paniculatum*)培养细胞中次级代谢物的合成^[2,3,11,12]。人参寡糖素对西洋参悬浮培养细胞的诱导,结果如图一所示。在西洋参细胞悬浮培养的中后期(培养18天)分别加入两种浓度(1mg/L和50mg/L)的人参寡糖素进行诱导。发现无论高浓度或低浓度的人参寡糖素,诱导后12h内,主要表现为强烈地诱导培养细胞中皂甙生物合成。随诱导时间的延长,皂甙含量有所降低,而明显地促进培养细胞的生长。诱导8天后,皂甙含量又渐渐回升,并高于对照。50mg/L寡糖素既能维持细胞较好地生长又能提高皂甙含量,因而得到较高的皂甙产率。人参寡糖素具有提高西洋参悬浮培养细胞中皂甙含量和促进细胞生长的双重作用,这在寡糖类包括微生物寡糖的诱导因子中尚未见报道过。

(四) 前体

已知人参培养细胞中皂甙生物合成是主途径^[13],植物甾醇生物合成则是分叉

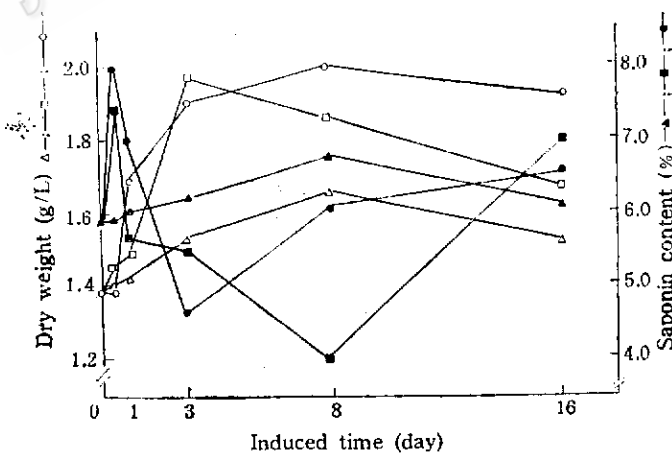


图1 人参寡糖素对西洋参细胞悬浮培养诱导的时间进程

Fig.1 The induced time process of oligosaccharin from *P.ginseng* on cell suspension culture of *P.quinquefolium*

△, ▲, Conc. of oligo. 0mg/l □, ■, Conc. of oligo. 1mg/l ○, ●, Conc. of oligo. 50mg/l

途径^[11], 都是甲羟戊酸途径在2,3-环氧角鲨烯处分叉。干扰其生物合成途径可以提高培养物中人参皂甙的含量。

在西洋参细胞悬浮培养中添加皂甙生物合成的三个重要前体乙酸钠、牦牛儿醇和角鲨烯, 结果如表3所示。除乙酸钠对西洋参培养细胞生长稍有促进外, 其余两种前体均不利于细胞生长。乙酸钠和角鲨烯促进皂甙的生物合成, 同时乙酸钠也提高植物甾醇含量。而牦牛儿醇和角鲨烯则降低植物甾醇含量。三种前体中角鲨烯提高皂甙含量最为有效。

总之, 我们采用的条体培养、真菌菌丝体、人参寡糖素以及前体均能调节西洋参悬浮培养细胞生长和皂甙的生物合成,

表3 前体对悬浮培养细胞生长、皂甙和植物甾醇含量的影响

Table 3 Effects of precursors on growth, saponin and phytosterol content of suspension culture cells of *P. quinquefolium*

Precursor (%)	Growth rate (mg d-w./L·day)	Dry weight (g/L)	Saponin content (%)	Phytosterol content (%)
Sodium acetate 0.25	109.2	3.71	4.8	7.4
Geraniol 0.01	85.6	2.84	3.8	5.0
Squalence 0.01	65.2	2.22	6.4	4.9
Control 0.00	103.8	3.53	3.9	5.4

这为今后西洋参细胞大量培养应用于工业化生产以及皂甙生物合成机理的研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Jhang, J.J. et al., *In Vitro*, 9(4), 253—259, 1974.
- [2] 郑光植等: 云南植物研究, 11(1), 97—102, 1989.
- [3] 周立刚等: 生物工程学报, 6(4), 316—321, 1990.
- [4] 周立刚等: 生物工程学报, 7(3), 230—234, 1991.
- [5] Murashige, T. and Skoog, P., *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473—497, 1962.
- [6] Furuya, T. et al., *Planta Medica*, 47(2), 200—204, 1983.
- [7] Luning, H.U. and Schlosser, A., *Z. Pflanzenkrankh Pflanzenschutz*, 82, 699—702, 1975.
- [8] Kesselmeier, J. and Loudonbach, I., In "Biochem Metabolism Plant Lipids" (Wintermans, J et al. eds.), pp. 585, Elsevier, 1982.
- [9] Deverall, B.J., In "Phytoalexin" (Bailey, J. A. et al. eds.), pp. 1, Blackie Glasgow-London, 1982.
- [10] Muller, K. and Borger, H., *Arb Btol Retchsanst Land Forstwirsh Berlin-Dalham*, 23, 189—231, 1940.
- [11] 甘炳远等: 植物生理学报, 16(4), 361—366, 1990.
- [12] 周立刚等: 天然产物研究与开发, 2(2), 22—25, 1990.
- [13] Dawill, A.G. and Albersheim, P., *Annu Rev Plant Physiol*, 35, 243—275, 1984.
- [14] Newman, A.A., In "Chemistry Terpens and Terpenoids", pp. 214, Academic Press, London, 1972.

Metabolic Regulation of Saponin Biosynthesis on Suspension Culture of *Panax quinquefolium* Cells

Fang Qimin Zheng Guangzhi Zhou Ligang

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming*)

Seven species mycelia of fungi were adopted as elicitors to increase the saponin content of suspension cultured cells of *Panax quinquefolium*, of the seven species, six ones were effective to stimulate saponin formation. Particularly, the mycelium of *Rhizopus stolonifer* doubled the content of saponin. Oligosaccharins from *P. ginseng* cultured cells, which was used as a new elicitor, promoted both cell growth and saponin formation. The saponin content and cell growth of *P. quinquefolium* were promoted, and saponin yield was the highest when the concentration of oligosaccharins was 50mg/L. Four kinds of plant cell culture liquids, which were added into the medium, all stimulated saponin biosynthesis. Especially, the conditional culture with the cell cultured liquid of *Salvia yunnanensis* increased the saponin content twice as much as the control. Three kinds precursors in the saponin in the saponin biosynthetic pathway were added into the medium to regulate the secondary metabolism of the cultured cells. The saponin content of cell cultures was increased more or less by using precursors mentioned above. Squalene played the most effective role in producing saponin among the precursors.

Key words

Panax quinquefolium; saponin; suspension culture; conditional culture; oligosaccharin; mycelia; precursor