西洋参冠瘿组织培养及其人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 的产生

于荣敏[1*] 宋永波[2] 张 辉[2] 叶文才[1] 张荫麟[3] 姚新生[1,2]

[1](暨南大学药学院,广州 510632)

[2](沈阳药科大学制药工程学院,沈阳 110016)

[3](中国医学科学院药用植物研究所,北京 310031)

摘 要 考察了培养基组成、培养时间、接种量、pH 值、肌醇浓度等对冠瘿组织生长及其人参皂苷含量的影响;用 HPLC 检测了冠瘿组织中人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 的含量。高压纸层析电泳证实,根癌农杆菌 Ti 质粒上的 T-DNA 片段已整合进入植物细胞核基因组中。在考察的 6 种培养基中,White 培养基最适合人参皂苷 Rg_1 的累积(0.095%),MS 培养基最适合人参皂苷 Re 的累积(0.194%)。以 MS 为基本培养基培养 36d、32d 时人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 累积含量最高(分别为 0.147%和 0.061%)接种量为 4g、2g (FW/flask),有利于人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 的累积;培养基 pH 5.8 时人参皂苷 Re 含量最高(0.184%),培养基 pH 5.6 时人参皂苷 Rg_1 累积量最高(0.054%);肌醇浓度为 0.05g/L 时,能促进人参皂苷 Re 合成(0.182%),浓度为 0.30g/L 时,有利于人参皂苷 Rg_1 累积(0.055%)。

关键词 西洋参,冠瘿组织培养,人参皂苷 Re,人参皂苷 Rg_1,高压液相色谱

中图分类号 R915;S567.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2003)03-0372-04

西洋参(*Panax quinquefolium*)原产于美国东部和加拿大,是五加科(Araliaceae)人参属植物,属名贵药材[1],具益肺阴、清虚火、生津止渴之功效,用于肺虚久咳、失血、咽干口渴、虚热烦倦等的治疗。西洋参的主要活性成分为人参皂苷类(Ginsenosides)化合物,多具有一定的生物活性,如人参皂苷 Re 能减少乙酰胆碱引起的豚鼠离体子宫的收缩,对大鼠有减慢心率和双相性血压(先升后降)作用,对猫的行为和脑电图显示中等程度的抑制作用;人参皂苷 Rg_1 除具有与人参皂苷 Re 相似的生物活性外,尚可增强大鼠骨髓细胞 DNA 的生物合成,对蛋白质或脂质的生物合成亦有一定的增强作用。西洋参生长期较长,易受病虫害、气候、环境及栽培技术等多种不利因素的影响,故产品远不能满足市场要求,且价格昂贵。本研究利用转基因技术将根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefeciens*)中 Ti 质粒上的一段 DNA(Transferred DNA,T-DNA)插入植物细胞核基因组而得到其表现型——冠瘿组织。该组织具有生长迅速、不需加入外源激素、次生代谢物含量高、遗传性状稳定等特点。本文在前期工作[2]的基础上考察了各种理化因子对西洋参冠瘿组织生长及其次生代谢产物人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 累积的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

胭脂碱型根癌农杆菌 C_{58} 菌株感染诱导西洋参茎获得的冠瘿组织,并经筛选驯化形成的稳定、优良的无性细胞系。

1.2 方法

1.2.1 西洋参冠瘿瘤的鉴定:称取新鲜的西洋参愈伤组织、冠瘿组织各 1g(鲜重,FW),加入 0.1mol/L HCl 低温研磨,匀浆后离心 5min(12 000r/min,4℃),用毛细管吸取上清液以及胭脂碱(Nopaline)、章鱼碱(Octopine)和精氨酸(Arginine)标准品点样在 Whatman 3 号滤纸上,滤纸点样端放在正极,400V 电压电泳 80min,顺方向取出滤纸,用热风吹干,放入 0.02%菲醌(溶于无水乙醇)和 10% NaOH(溶于 60%乙醇)等体积混合的染液中染色 30s,风干后在紫外灯(254nm)下观察、摄影。

1.2.2 西洋参冠瘿组织生长条件的考察:基本培养条件:将由胭脂碱型根癌农杆菌 C_{58} 菌株诱导产生的冠瘿组织优良系分别接种在装有 40mL 经 121℃、高压灭菌 20min 的固体培养基的 100mL 三角瓶中,置于 25±1℃的恒温培养箱中暗培养,琼脂为 0.8%。固体培养冠瘿组织生长参数测定:参见文献[2]。

1.2.3 人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 的 HPLC 检测:总皂苷的提取[3-4]:取干燥培养物粉碎、称重,先用氯仿脱脂 1.5h,再用甲醇于 70℃水浴回流 6h,回收甲醇得提取物 1。该提取物用蒸馏水溶解,用水饱和的正丁醇萃取 4 次,回收正丁醇得提取物 2。提取物 2 用蒸馏水溶解,上 D101 大孔树脂柱,流速 1.5mL/min,水洗脱,再用 20%乙醇洗脱,最后用 70%乙

收稿日期:2002-11-13,修回日期:2003-02-28。

* 通讯作者。 Tel:86-20-85228205; Fax:86-20-85228205; E-mail:rongminyu99@hotmail.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

醇洗脱，收集洗脱液，回收乙醇得提取物 3。提取物 3 用甲醇溶解、定容、过滤，待用。

HPLC 色谱条件：色谱分析柱为 Diamonsil™ C-18（200mm × 4.6mm，5μm）；流动相：乙腈∶水 = 18.5∶81.5；流速：1.0mL/min；进样量：20μL；检测波长：203nm；柱温为室温。

检测波长的选择：将人参皂苷 Rg_1 对照品的甲醇溶液在 200 ~ 400nm 波长范围内进行扫描，人参皂苷 Rg_1 对照品在 202.8nm 处有吸收峰，因此选择 203nm 为检测波长[5]。

线性关系考察：精密称取 5mg 人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 对照品，分置 5mL 容量瓶中，甲醇溶解，定容至刻度，摇匀，作为储备液。分别将人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 用色谱纯甲醇稀释成不同浓度，按上述分析条件，以人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 浓度对峰面积作图。结果表明，人参皂苷 Re 在 125 ~ 12.5μg/mL 范围内成良好的线性关系，其回归方程为：$C = 1 \times 10^{-4} A + 13.4$（μg/mL），$r = 0.9998$（n = 4）；人参皂苷 Rg_1 在 50 ~ 2μg/mL 范围内成良好的线性关系，其回归方程为：$C = 1 \times 10^{-4} A + 11.7$（μg/mL），$r = 0.9996$（n = 4）。

样品测定：取不同培养条件下所获西洋参冠瘿组织样品溶液和对照品稀释液，分别进样 20μL，读取峰面积值。以外标工作曲线法根据回归方程计算人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 含量。

2　结果与讨论

2.1　西洋参冠瘿组织的鉴定

胭脂碱型根癌农杆菌 C_{58} 菌株中 Ti 质粒上的 T-DNA 中含有胭脂碱合成酶基因，植物染色体内不含该基因，如果 Ti 质粒将该基因导入了植物细胞，且在转化的植物细胞中表达，则在诱导出来的冠瘿组织中就应检测到胭脂碱，则表明转化成功。

经高压纸电泳实验证实，西洋参冠瘿瘤组织中有胭脂碱斑点，说明由胭脂碱型根癌农杆菌 C_{58} 菌株诱导的冠瘿组织整合了 Ti 质粒的 T-DNA 片段，而西洋参愈伤组织中没有胭脂碱和农杆碱斑点。鉴定结果如图 1 所示。

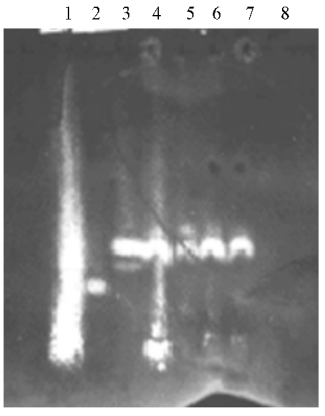

图 1　西洋参冠瘿组织中冠瘿碱的纸电泳测定

Fig.1　Paper electrophoresis analysis of opines from the crown gall of *Panax quinquefolium*

1. Arginine；2. Octopine；3. Nopaline；4 ~ 7. Crown gall of *Panax quinque folium induced* by C58；8. Callus of *Panax quinquefolium*

2.2　西洋参冠瘿组织生长曲线及人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re 累积曲线

考察了冠瘿组织在添加 3% 蔗糖的 MS 培养基上的生长状况及人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 累积状况。结果见表 1。

表 1　不同生长期冠瘿组织重量和人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 含量

Table 1　Culture weight of crown gall and the content of ginsenoside Re and ginsenoside Rg_1 at the different culture period

Culture time /d	Cultures weight (DW) per flask/g	Re content /%	Rg_1 content /%
4	0.106	0.044	0.035
7	0.137	0.052	0.022
11	0.213	0.074	0.028
15	0.274	0.104	0.035
19	0.336	0.093	0.048
22	0.386	0.097	0.050
25	0.483	0.122	0.056
29	0.466	0.128	0.059
32	0.416	0.134	0.061
36	0.396	0.147	0.042
39	0.394	0.107	0.044
44	0.369	0.023	0.019

由表 1 可知，西洋参冠瘿组织在 MS 固体培养基、25℃、暗培养条件下，0 ~ 7d 为缓慢生长期，7 ~ 25d 为对数生长期（25d 生长量最大），25 ~ 30d 为稳定期，此后为衰减期，冠瘿组织呈负增长，干重下降，培养基的营养成分已显不足。总的看来，冠瘿组织生长速度较快，接种第 7 天干重就增加了 1 倍多，到第 25 天干重增加 4 倍，其生长曲线大致呈‘S’型，没有出现典型的延迟期，可能是开始接种的冠瘿组织正处于旺盛生长期，转接后生长没有停顿。人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 累积的变化也呈现一定的规律性：先是下降期（人参皂苷 Rg_1：0 ~ 7d；人参皂苷 Re：0 ~ 11d），其后为上升期（人参皂苷 Rg_1：8 ~ 32d；人参皂苷 Re：12 ~ 36d），再后为下降期。人参皂苷 Rg_1 的含量在第 32d 达到最高（0.061%，人参皂苷占冠瘿组织培养物干重的百分含量，下同），人参皂苷 Re 的含量在 36d 达到最高（0.147%）。综合考虑，人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re 的产率分别在 25d 和 29d 达最高，是继代或收集样品的最佳时期。

2.3　生长培养基和合成培养基的筛选

各种培养基由于所含组分及其比例的不同，对西洋参冠瘿细胞的生长及次生代谢产物的形成呈现不同程度的影响（表 2）。在 6 种培养基中，MS 培养基既有利于冠瘿组织生长

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

(25d 收获时干重达到 6.73 倍),又有利于人参皂苷 Re 的产生(含量达 0.194%,产率为 8.19×10^{-4} g/flask(DW))。White 培养基上人参皂苷 Re 的累积量达 0.095%,产率为 2.13×10^{-4} g/flask(DW),但冠瘿组织成块状,分散性不好,不利于建立悬浮培养体系。故本实验选择高盐浓度的 MS 培养基作为西洋参冠瘿组织维持及试验的基本培养基。

表 2 冠瘿组织培养和人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 累积培养基的筛选

Table 2 Selection of media for the crown gall growth and the accumulation of ginsenoside Re and ginsenoside Rg_1

Media	Growth amount(DW) per flask/g	Re content /%	Rg_1 content /%
6,7-V	0.175	0.077	0.054
H	0.139	0.141	0.010
B5	0.276	0.170	0.013
White	0.224	0.143	0.095
Wood	0.202	0.077	0.044
MS	0.422	0.194	0.044

2.4 接种量对冠瘿组织生长及人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re 合成的影响

由表 3 可知,接种量对冠瘿组织的生长有较大的影响。接种量为 2 ~ 4g/flask(FW)时,相对生长速率较高(3.090 ~ 3.300g/flask(FW)),也较有利于人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 累积;低于最适量时,生长相对较慢或不生长。分析原因,可能是超过最适量,营养物质相对匮乏,从而使对数生长期缩短,培养物的生长速率降低,代谢活动减慢而较早停止生长。

表 3 接种量对冠瘿组织生长和人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 累积的影响

Table 3 Effects of the inoculum amount on the tissue growth and the accumulation of ginsenoside Re and ginsenoside Rg_1

Inoculum amount per flask/g	Relative growth amount (FW) per flask/g	Re content /%	Rg_1 content /%
2	3.090	0.168	0.059
4	3.300	0.171	0.052
6	2.284	0.142	0.043
8	1.364	0.137	0.037
10	0.813	0.111	0.032
12	0.687	0.122	0.027
14	0.572	0.108	0.026
16	0.539	0.073	0.021

2.5 pH 对冠瘿组织生长及人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re 合成的影响

pH 是影响细胞生长的重要因素之一。它可影响质膜的渗透性及细胞对营养物质的吸收程度。本研究考察了不同 pH 条件下的 MS 培养基对西洋参冠瘿组织生长及人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 合成的影响。由表 4 可知,pH 值在 5.2 ~ 5.8 之间适于西洋参冠瘿瘤组织的生长,在 5.4 ~ 5.8 之间有利于人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 合成,pH 值低于 5.2 和高于 6.0 时冠瘿组织生长和人参皂苷的合成均受到不同程度的抑制。综合考虑,为了得到较高的产率,选择 pH 5.4 的 MS 培养基。

表 4 pH 对冠瘿组织生长及人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re 合成的影响

Table 4 Influences of pH on the tissue growth and the accumulation of ginsenoside Re and ginsenoside Rg_1

pH value	Growth amount(DW) per flask/g	Re content /%	Rg_1 content /%
5.2	0.334	0.083	0.031
5.4	0.447	0.133	0.048
5.6	0.352	0.176	0.054
5.8	0.315	0.184	0.052
6.0	0.294	0.153	0.038
6.2	0.316	0.076	0.020

2.6 肌醇对冠瘿组织生长及人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re 合成的影响

肌醇是 MS 培养基中含量较大的一种有机成分,为了寻求西洋参冠瘿组织生长及人参皂苷累积的最适肌醇浓度,在 MS 培养基其它成分保持不变的条件下,考察了 0.00、0.05、0.10、0.20、0.30 和 0.40g/L 肌醇浓度对冠瘿组织生长及人参三醇类皂苷累积的影响。

表 5 肌醇对冠瘿组织生长及人参皂苷 Rg_1、Re 合成的影响

Table 5 Effect of inositol concentration on the tissue growth and the accumulation of ginsenoside Re and ginsenoside Rg_1

Inositol content /(g/L)	Growth amount(DW) per flask/g	Re content /%	Rg_1 content /%
0.00	0.307	0.135	0.014
0.05	0.330	0.182	0.019
0.10	0.394	0.129	0.039
0.20	0.349	0.107	0.053
0.30	0.293	0.089	0.055
0.40	0.242	0.074	0.035

由表 5 可知,在无激素的 MS 培养基中附加不同浓度的肌醇对细胞生长及人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg_1 的累积影响显著。肌醇浓度为 0.05g/L 时,明显促进人参皂苷 Re 的累积,其含量明显高于其它组。肌醇浓度为 0.30g/L 时,有利

© 《生物工程学报》版权所有,未经许可不得转载 http://journals.im.ac.cn

于人参皂苷 Rg_1 的累积。浓度过高或过低，均影响人参皂苷的累积。肌醇浓度为 0.10g/L 时，有利于冠瘿组织生长。

本文对胭脂碱型根癌农杆菌 C_{58} 菌株转化西洋参获得的冠瘿组织进行了鉴定，并对固体培养条件进行了初步考察。鉴定 T-DNA 片段是否已经整合进入西洋参的核基因组中的方法很多，如 PCR 扩增、Southern 印迹杂交和纸电泳等方法。其中高效纸电泳法是一种简便、高效的鉴定方法，无需贵重的药品及特殊的设备。试验过程中曾尝试用高效硅胶板测定，但效果并不理想。利用硝酸银也可显色，但需在暗室进行，染色过程繁琐，故实验选用菲醌染色液显色。

培养过程中还发现，西洋参冠瘿组织较愈伤组织和无菌苗容易培养，且不易染菌，具有一定的抑菌性，有利于大规模培养和生产。西洋参冠瘿组织在 MS 培养基中的增长倍数为 7.07 倍。人参皂苷 Re 含量在 0.023% ~ 0.194% 之间，人参皂苷 Rg_1 含量在 0.010% ~ 0.061% 之间。

在提取过程中，本实验利用了大孔树脂去色素、糖等杂质。该法具有选择性好、吸附容量大、解吸容易等优点，由 HPLC 图谱可见，杂质峰较少，但也发现所测皂苷含量低于在同样条件下未经大孔树脂处理的样品中皂苷含量。

冠瘿组织培养是植物生物工程领域的研究热点之一，有关研究报道很多。但西洋参冠瘿瘤培养的研究除本课题组外，尚未见其它研究报道。本研究为利用转基因器官——西洋参冠瘿组织生产药用人参皂苷类化合物提供了有价值的参考资料。

REFERENCES(参考文献)

[1] FAN D D(范代娣), LI B Z(李宝璋). Study on liquid culture and kinetics of *Panax quinquefolium* cell. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1993, **9**(4): 361 – 366

[2] YU R M(于荣敏), SONG Y B(宋永波), LI X(李铣) *et al*. Study on effects of culture condition of crown gall tissue from *Panax quinquefolium* on the ginsenoside Rb_1 content. *Pharmaceutical Biotechnology*(药物生物技术), 2002, **9**(4): 216 – 219

[3] SOLDATI F, STICHER O. HPLC separation and quantitative determination of ginsenosides from *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and from ginseng drug preparations. *Plant research*, 1980, **38**: 348

[4] WILLIAM A C, JOHN G H, JAMA E. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of ginsenosides of *Panax quinquefolium*. *Journal of Chromatography A*, 1996, **755**: 11

[5] ZHU W H(朱蔚华), LI X L(李新兰), QI L M(齐玲敏) *et al*. The study on tissue culture of *Panax quinquefolium*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药), 1980, **11**(10): 471 – 472

Study on the Culture of Crown Gall from *Panax quinquefolium* and the Prouction of Its Secondary Metabolites——Ginsenosides Re and Rg_1

YU Rong-Min[1*]　SONG Yong-Bo[2]　ZHANG Hui[2]　YE Wen-Cai[1]　ZHANG Yin-Lin[3]　YAO Xin-Sheng[1,2]

[1](*College of Pharmacy*, *Jinan University*, *Guangzhou* 510632, *China*)

[2](*College of Pharmaceutical Engineering*, *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang* 110016, *China*)

[3](*Institute of Medicinal Plants*, *Chinese Academy of Medical Sciences*, *Beijing* 100094, *China*)

Abstract　It was clearly demonstrated that T-DNA of *Agrobacterium tumefeciens* Ti plasmid was integrated into the cells of crown gall in our experiment. This paper reported the influences of some kinds of physical-chemistry factors on the growth of crown gall of *Panax quinquefolium* and the production of its main active compounds —— ginsenoside Re and ginsensoside Rg_1. The results showed that White medium was the best one for ginsensoside Rg_1 accumulation(0.095%) among the six media, but ginsensoside Re accumulation(0.194%) was the highest on the MS medium; The highest contents of ginsensoside Re(0.147%) and ginsensoside Rg_1(0.061%) were on the culture 36d and 32d after innoculum respectively; The optimum pH was 5.6 for ginsensoside Rg_1 synthesis(0.054%), and 5.8 for ginsensoside Re synthesis(0.184%); The contents of ginsensoside Re and ginsensoside Rg_1 was the highest in the inoculum of 4g and 2g/flask(FW) respectively. The result also indicated that the concentration of inositol in 0.05g/L could obviously promote ginsensoside Re synthesis(0.182%), and in 0.30g/L for ginsensoside Rg_1 (0.055%).

Key words　*Panax quinquefolium*, crown gall culture, ginsenoside Re, ginsenoside Rg_1, HPLC

Received: 11-13-2002.

* Corresponding author.　Tel: 86-20-85228205;　Fax: 86-20-85228205;　E-mail: rongminyu99@hotmail.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn