

黄芪毛状根化学成分和免疫功能活性的研究

郑志仁* 刘 滌** 宋纯清 陈长勋¹ 胡之璧

(上海中医药大学中药学院中药生物工程研究室 药理研究室¹ 上海 200032)

摘 要 应用大规模培养技术生产的黄芪毛状根, 获得 10g/L 的产量。与黄芪干燥根化学成分相比, 黄芪毛状根中粗皂甙和可溶性多糖含量较高, 黄芪甲甙含量相当, 而 6 种异黄酮, 总多糖和酸性多糖含量较少, 证明两种来源的黄芪根质量相似。从免疫功能低下的小鼠免疫功能恢复的实验结果也证实了这一点。本结果显示大规模培养生产的黄芪毛状根可能成为中药材黄芪的一种新来源。

关键词 黄芪, 毛状根, 化学成分, 免疫功能

学科分类号 Q949.95

黄芪(膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus*, 蒙古黄芪 *A. mongholicus*)是我国重要的传统药材。具有补气固表, 利尿托毒, 排脓, 生肌敛疮和利水消毒作用, 是许多复方和中成药的重要成分, 我们每年需求量 600 万 kg^[1]。由于野生资源逐年减少和栽培品种品质下降, 给临床使用和中成药制造带来一定的困难。由发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 感染双子叶植物形成的毛状根, 由于生长迅速, 生化性质和遗传性稳定以及易于进行基因操作等特点, 近年来已发展成为继细胞培养后又一有用的培养系统^[2]。利用毛状根培养系统工业化生产黄芪的尝试将为中药材新资源研究提供一条可行的新途径^[3]。本文报导了利用大规模培养技术生产的黄芪毛状根化学成分分析和提高实验动物免疫活性的实验结果。

1 材料与方 法

1.1 毛状根培养系统的建立

按 Hu 和 Alfermann 介绍的方法^[4]诱导、选择和建立黄芪毛状根培养系统。通用培养基为 MS 培养基^[5], 由于 NH₄NO₃ 对黄芪毛状根生长具有抑制作用而加以去除。为促进生长添加 1g/L 水解酪蛋白, 3% 蔗糖。培养基 pH 为 5.8。培养条件为 25 ± 1℃, 黑暗, 摇床转速 100r/min。培养基体积为 50ml (250ml 三角瓶), 接种量为每瓶 0.5g 鲜重, 15d 继代培养一次。

1.2 毛状根的大规模培养

设计了不同体积(3.5 和 10L)的通气培养装置进行黄芪毛状根的大规模培养^[6], 其

本研究得到国家科委医药技术创新博士项目基金, 上海市科技发展基金和上海市教育委员会科研基金资助。

* 现为中国科学院上海植物生理研究所博士后。

** 通讯联系人。

收稿日期: 1997-03-24, 修回日期: 1997-10-13。

中 10L 体积的培养装置见图 1。接种量分别为 10、15 和 30g 鲜重,培养 3 个星期后收获毛状根并称量鲜重,冰冻干燥后称量干重。

1.3 粗皂甙和甲甙含量的测定

5g 干燥粉末,加入 150ml 80% 甲醇回流 2h,共 3 次,合并滤液,减压浓缩至干。然后在水和正丁醇(*n*-BuOH)之间进行分配,将 *n*-BuOH 部分减压浓缩干燥,称重法测定粗皂甙含量。利用 HPLC 法测定黄芪甲甙含量,色谱柱为 Nucleosil C₁₈柱(4.6mm×250mm, 5Micron),流动相为乙腈:水=1:2,流速为 0.8ml/min,检测波长为 205nm。样品为用甲醇配制的含有适当浓度皂甙的溶液。

1.4 异黄酮类化合物含量测定

用 HPLC 法定量分析异黄酮类化合物,色谱柱 Nucleosil C₁₈柱,流动相为甲醇:水=3:2 和 甲醇:水=1:1,流速为 0.6ml/min,检测波长为 254nm 和 280nm。样品经甲醇(80%)提取,乙酸乙酯分配,减压蒸干后用甲醇定容,采用同一样品 2 次进样,分别测定 6 种异黄酮类化合物的含量。其中,10-羟基-3,9-二甲氧基紫檀烷(1),(3R)-8,2'-二羟基-7,4'-二甲氧基异黄酮(2),8,3'-二羟基-7,4'-二甲氧基异黄酮(4),2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖吡喃糖甙(5)的最大吸收波长为 280nm,而芒柄花素(7-羟基-4'-甲氧基异黄酮)(3)和毛蕊异黄酮(7,3'-二羟基-4'-甲氧基异黄酮)(6)的最大吸收波长为 254nm。

1.5 多糖含量测定

0.1g 干燥粉末,用 80% 乙醇提取 3 次,合并上清液,加活性炭过滤,此滤液为可溶性多糖。残渣继以三氯醋酸 80℃ 提取 3 次,合并滤液,此为酸性多糖。二部分多糖分别用硫酸-苯酚法^[7]测定含量,总和为总多糖含量。

1.6 小鼠免疫功能的恢复

采用腹腔注射环磷酰胺(CPA,每隔 2d 注射 50mg/kg)造成小鼠免疫功能低下模型,分别以黄芪干燥根和毛状根水煎液给药(10g/kg),由免疫器官重量,单核细胞吞噬功能,溶血素抗体形成和淋巴细胞转化率作为观察指标^[8],全部结果以百分数表示,对照组(生理盐水)为 100%。

2 结果与讨论

2.1 黄芪毛状根的大规模培养

用 3, 5, 10L 体积的容器装置成毛状根大规模培养设备(见图 1),培养 3 个星期后,毛状根生长量分别达到 9.7g/L, 10.9g/L 和 9.4g/L(表 1),为初始接种量的 29, 35 和 30 倍,与 Toivonen 等在气升式发酵罐中培养长春花毛状根的产量相近^[9]。

2.2 黄芪干燥根与毛状根中粗皂甙和黄芪甲甙的含量

表 2 给予了黄芪干燥根和毛状根中粗皂甙和黄芪甲甙的含量,结果证实毛状根中粗皂甙的含量是干燥根的 2.6 倍,而甲甙含量基本相同。黄芪甲甙是中药材黄芪的有效成分^[10],故本实验在测定总皂甙的同时还比较了黄芪甲甙的含量。

2.3 黄芪干燥根与毛状根中 6 种异黄酮类化合物的含量

6 种异黄酮成分在黄芪干燥根和毛状根中的含量见表 3。所检测的 6 种异黄酮类化合物中,总含量和 1, 2, 5 三种异黄酮成分在黄芪干燥根中的含量超过毛状根,3, 6 相差不

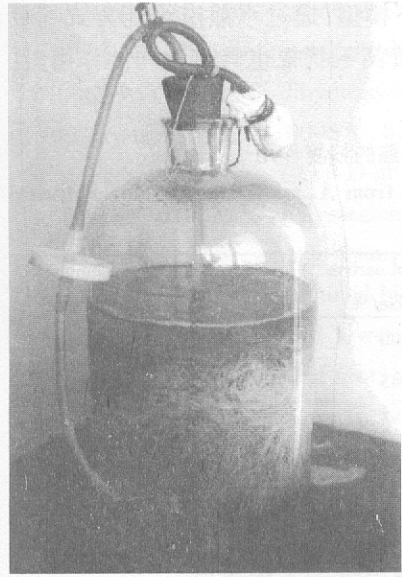


图 1 黄芪毛状根大规模培养

Fig. 1 Large-scale culture of hairy roots of *A. membranaceus*

表 1 黄芪毛状根大规模培养

Table 1 Large-scale culture of hairy roots from *A. membranaceus*

Culture volume /L	Inoculum amount /g(FW)	Growth time /d	Harvesting amount	
			Fresh weight /g	dry weight /g
3	10	15	285	29.1
5	15	20	510	54.6
10	30	20	980	94.9

表 2 黄芪干燥根和毛状根中粗皂甙和黄芪甲甙含量比较

Table 2 Comparison of crude saponin and astragaloside IV contents in dry and hairy roots from *A. membranaceus*

Sample	Crude saponin /%	Astragaloside IV /mg·g ⁻¹
Dry roots	2.24	0.15
Hairy roots	5.81	0.14

图 1 黄芪毛状根大规模培养

Fig. 1 Large-scale culture of hairy roots of *A. membranaceus*

多,而 4 有相反的结果。化合物 1, 2, 4 是具有新结构的异黄酮类化合物,未见前人报道^[11]。

2.4 黄芪干燥根和毛状根中多糖的含量

虽然黄芪干燥根和毛状根中可溶性多糖和酸性多糖含量有差异,但总多糖含量非常接近(表 4)。

表 3 黄芪干燥根与毛状根中 6 种异黄酮类化合物含量比较

Table 3 Comparison of six isoflavonoid contents in dry and hairy roots from *A. membranaceus*

Sample	Isoflavonoid content/%						Total
	1*	2	3	4	5	6	
Dry roots	0.0089	0.0052	0.0008	0.0019	0.0063	0.0037	0.0268
Hairy roots	0.0065	0.0007	0.0005	0.0042	0.0037	0.0032	0.0188

* (1)10-hydroxy-3, 9-dimethoxypterocapan, (2)(3R)-8, 2'-dihydroxy-7, 4'-dimethoxyisoflavan, (3)formononetin (7-hydroxy-4'-methoxy-isoflavone), (4)8, 3'-dihydroxy-7, 4'-dimethoxyisoflavone, (5)2'-hydroxy-3', 4'-dimethoxyisoflavan-7-O-β-D-glucopyranoside, (6)calycosin (7, 3'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone).

表 4 黄芪干燥根和毛状根中多糖含量比较

Table 4 Comparison of polysaccharide content in dry and hairy roots from *A. membranaceus*

Sample	Polysaccharide content/%		
	Total	Soluble	Acidic
Dry roots	26.03	0.76	25.27
Hairy roots	22.97	14.88	8.29

2.5 黄芪干燥根和毛状根增强小鼠的免疫作用

黄芪所含的多糖类化合物具有提高动物免疫功能的作用,已在许多研究中得到证

实^[12,13]。采用腹腔注射环磷酰胺造成小鼠免疫功能低下模型,通过水煎液给药方式饲喂证实干燥根具有恢复这种小鼠免疫功能的作用。同样,黄芪毛状根也具有相同的作用,且它们的作用效价基本相似,与表 4 的结果一致。

表 5 黄芪干燥根和毛状根对小鼠免疫功能的恢复作用

Table 5 Renewal of immunological function by dry and hairy roots from *A. membranaceus* on rats treated with cyclophosphamide

	Spleed weight / %	Thymus weight / %	Clean of carbon particle/ %	Transformation of lymphatic cells/ %	Hemolysin formation/ %
Control	100	100	100	100	100
CPA(Cyclophosphamide treat)	69	56	45	75	3
Dryed roots + CPA	94	88	70	93	8
Hairy roots + CPA	89	79	68	87	8

总之,本文研究的结果说明利用大规模培养方法生产高质量的黄芪毛状根可能成为黄芪的新资源,为最终解决我国中药品种短缺和质量不稳提供一条新途径。

参 考 文 献

- 1 赵 杰. 见:中国药材公司编著,中国常用中药材,北京:科学出版社,1995,495~502
- 2 Toivonen T. *Biotechnol Prog*, 1993, 9: 12~20
- 3 胡之璧,刘 涑. 上海中医药大学学报,1996-1997, 10-11: 94~97
- 4 Hu Z B, Alfermann A W. *Phytochemistry*, 1993, 32: 699~703
- 5 Murashige T, Skoog F. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473~497
- 6 郑志仁,袁信松,刘 涑等. 植物生理通讯,1997, 33: 133~134
- 7 Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K *et al.* *Anal Chem*, 1956, 28: 350~356
- 8 陈 奇主编,中药药理研究方法学. 北京:人民出版社,1993, pp: 706~712
- 9 Toivonen T, Ojaka M, Kauppinen V. *Biotechnol Lett*, 1990, 12: 519~524
- 10 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典. 广州:广东科技出版社,1995, pp. 271~272
- 11 宋纯清,郑志仁,刘 涑等. 植物学报,1997, 39: 764~768
- 12 中国科学院上海药物研究所,上海第二医学院病理解剖教研组电镜室. 科学通报,1979, 16: 764~768
- 13 沈美玲,翟世康,罗英德等. 中西医结合杂志,1984, 4: 615~617

Studies on Chemical Constituent and Immunological Function Activity of Hairy Root of *Astragalus membranaceus*

Zheng Zhiren Liu Di Song Chunqing Cheng Changxun* Hu Zhibi

(Laboratory of Biotechnology of Chinese Materia Medica, Laboratory of Pharmacology*,

Chinese Materia Medica College, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032)

Abstract Using large-scale culture technique the hairy roots of *Astragalus membranaceus* were largely produced and their yield reached at 10g/L. The results from RP-HPLC detection showed that

the contents of crude saponin and astragaloside IV in the hairy roots were 5.81 and 0.14%, respectively. Six isoflavonoid compounds were also determined: 10-hydroxy-3,9-dimethoxypeterocarpan 0.0065%, (3R)-8,2'-dihydroxy-7,4'-dimethoxyisoflavan 0.0007%, formononetin (7-hydroxy-4'-methoxy-isoflavone) 0.0005%, 8,3'-dihydroxy-7,4'-methoxyisoflavone 0.0042%, 2'-hydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-O- β -D-glucopyranoside 0.0037%, calycosin (7,3'-dihydroxy-4'-methoxy-isoflavone) 0.0032%. Polysaccharide analysis showed that total polysaccharide content in the hairy roots was 22.97%, among them, acidic 8.29% and soluble 14.88%. In comparison with the dry roots, the hairy roots contained higher crude saponin and soluble polysaccharide contents, similar astragaloside IV content and lower 6 isoflavonoids, total and acidic polysaccharide contents, showing the quality of both types of roots was similar. Renewal of immunology-function-low rats after feeding the aqueous extract of hairy roots produced by large-scale culture showed its capacity similar to the dry roots of *A. membranaceus* increasing the immunology function. The results in this paper give evidence that the hairy roots may be a new source of *A. membranaceus*.

Key words *Astragalus membranaceus*, hairy roots, chemical constituents, immunological function