

太子参细胞悬浮培养及其皂苷含量分析

林龙云, 周以飞, 潘大仁*

(福建农林大学作物科学学院, 福州 350002)

摘要: 以太子参的幼叶为外植体, 诱导培养获得太子参愈伤组织, 并通过细胞悬浮培养获取皂苷。结果表明: 用 MS+BA 0.2 mg L⁻¹+2,4-D 1.0 mg L⁻¹+KT 1.0 mg L⁻¹ 液体培养基可获得大量繁殖速度快、生长均匀一致的悬浮细胞。由细胞悬浮培养获得的太子参皂苷的 HPLC 色谱峰值与常规种植及组培苗的相同, 但纯度较好。细胞悬浮培养约 30 d 时, 每克干重细胞的培养液内可提取总皂苷量为 2.13-2.92 mg, 略低于大田常规种植所收获的每克干重太子参块根内的总皂苷含量(3.6-4.3 mg), 与组培苗收获的太子参块根内的总皂苷含量相近。

关键词: 药用植物; 太子参; 细胞悬浮培养; 皂苷

中图分类号: Q813.11

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)06-0499-06

Cell Suspension Culture of *Pseudostellaria heterophylla* and Its Saponin Content Analysis

LIN Long-yun, ZHOU Yi-fei, PAN Da-ren*

(College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Callus was induced from the young leaves of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax and saponin was obtained by way of cell suspension culture. Plenty of incompact and rapid growing suspension cells were obtained from cultures grown in liquid medium of MS supplemented with 0.2 mg L⁻¹ BA, 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D and 1.0 mg L⁻¹ KT. The HPLC chromatograms of saponin from suspension cell culture to that from conventionally field-grown or tissue culture seedlings. After about 30 days' cell suspension culture, the total content of saponin in cultural fluid reached 2.13-2.92 mg g⁻¹ DW cells, which was slightly lower than that from the roots of conventionally field-grown seedlings, and was close to that from the roots of tissue culture plantlets.

Key words: Medicinal plant; *Pseudostellaria heterophylla*; Cell suspension culture; Saponin

太子参 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax] 为石竹科植物, 又名孩儿参、童参, 其块根含有皂苷、多糖、氨基酸等活性物质。其性味甘、微苦, 平, 归脾、肺经。还具有益气健脾, 生津润肺的功能。主要用于脾虚体倦, 食欲不振, 病后虚弱, 气阴不足, 自汗口渴, 肺燥干咳^[1]。现代药理研究表明其有抗疲劳、抗应激作用, 并有促进免疫作用及延长寿命之功能^[2], 其中太子参皂苷还具有抗病毒作用^[3]。

太子参愈伤组织的获得比较困难^[4], 细胞悬浮培养体系的建立更加不易, 通过细胞悬浮培养提取次生代谢物在太子参上还未见报道。本研究通过太子参愈伤组织诱导, 建立细胞悬浮培养体系, 测定细胞悬浮培养过程次生代谢产物的含量, 以期应用发酵技术开发生物药物及其产业化生产提供依据。

收稿日期: 2005-06-06 接受日期: 2005-09-19

基金项目: 福建省教委课题 JB03157

* 通讯作者 Corresponding author

1 材料和方法

1.1 供试材料

太子参 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax 样品取自福建省柘荣县大田种植的柘参中号 (ZPM) 和柘参大号 (ZPL) 原种, 并从两种太子参的不同外植体培育出茎尖脱毒苗 (AMP)、愈伤组织分化苗 (CP)、种子组培苗 (SP)^[4]。在福建农林大学标本园, 按 3 次重复随机区组设计, 以常规方法进行种植, 收获。

1.2 细胞悬浮系的建立

愈伤组织的诱导与增殖 取太子参试管苗的嫩叶接种于 MS 配合不同激素组合的培养基中 (表 1), 观察比较其愈伤组织的诱导和增殖。

悬浮细胞系的建立 将生长均匀、质地松散、淡黄色半透明状的愈伤组织转移到液体培养基中进行悬浮培养, 以 MS 作为基本液体培养基, 配合不同激素组合 (表 2)。用旋转式摇床以 120 r min^{-1} 进行悬浮培养。定期观察培养液内愈伤组织的生长情况及悬浮细胞或细胞团的生长变化, 观测数据均为 3 次重复, 建立悬浮细胞生长曲线。

1.3 太子参皂苷单体的高效液相色谱法 (HPLC 法) 检测

样品处理 悬浮液过 400 目筛, 取太子参细胞。将太子参细胞、愈伤组织、3 种组培苗参根、2 种柘参原种苗参根均于 55°C 烘干至恒重, 粉碎, 过 40 目筛, 备用^[5-6]。

总皂苷提取 参照许茜等《太子参皂苷提取工艺优选》所述的优选方法^[7]提取各样品总皂苷。

培养液内总皂苷提取方法 取培养 2 g 干重的细胞所需的太子参细胞培养液, 浓缩至一定体积后, 同上法直接经醇沉淀提取总皂苷, 得总皂苷甲醇溶液, 4°C 保存待测。

HPLC 法检测太子参皂苷单体 参照人参皂苷 Rb1 的 HPLC 测定方法^[8], 太子参皂苷单体高效液相色谱检出分析采用日本岛津液相色谱仪。

1.4 皂苷标准曲线的建立

标准溶液的制备 以人参皂苷 Rb1 对照品, 加甲醇溶解配制 1.0 mg ml^{-1} 的标准溶液。

标准曲线绘制 参照许茜等《太子参皂苷提取工艺优选》的方法^[7], 得方程: $y = 0.2562x + 0.0011$, $R^2 = 0.9995$, 即人参皂苷 Rb1 在 $0.02\text{--}0.12 \text{ mg ml}^{-1}$

范围内线性良好。

1.5 总皂苷含量测定

太子参样品 (块根粉末、细胞、愈伤组织、细胞培养液) 处理如步骤 1.3, 3 次重复, 于 560 nm 波长处测定样品吸收值 (A), 依回归方程求算出每克干重的样品内所含的总皂苷含量。

2 结果和分析

2.1 悬浮细胞系的建立

2.1.1 不同激素组合的培养基对愈伤组织诱导增殖的影响

已有报道通过太子参种子诱导获得愈伤组织, 但该来源的愈伤组织在第 3 代培养时即发生分化成苗^[4], 所以其增殖数太小, 不利于细胞悬浮培养的利用。本试验表明, 从嫩叶获得愈伤组织可进行多代的增殖, 可用于培养细胞悬浮系。

从表 1 可见, $\text{MS}+\text{BA } 0.2 \text{ mg L}^{-1}+\text{2,4-D } 1.0 \text{ mg L}^{-1}$ 效果最好, 30 d 后在黄褐色的组织上长出淡黄色的新鲜愈伤组织, 增殖倍数最高, 说明太子参愈伤组织在这一培养基上生长较为旺盛。另外两组培养基增殖效果较差, 特别是第 3 组在培养基中加入 KT 的作用不明显, 甚至可能抑制增殖的速度和水平。

2.1.2 不同激素组合的培养液对悬浮细胞系建立的影响

从表 2 可知, 12 种组合的配方对悬浮细胞系建立的效果明显不同。其中第 6 组 $\text{MS}+\text{BA } 0.2 \text{ mg L}^{-1}+\text{2,4-D } 1.0 \text{ mg L}^{-1}+\text{KT } 1.0 \text{ mg L}^{-1}$ 效果最好: 30 d 内, 细胞增殖 5 倍, 且颜色为淡黄色, 肉眼可见培养液中悬浮着大量的细胞及细胞团, 说明太子参细胞可以在这一组合的培养液中很好地生长, 并形成悬浮细胞系。MS+BA $0.2 \text{ mg L}^{-1}+\text{2,4-D } 2.0 \text{ mg L}^{-1}$ 效果次之; 增殖 4.2 倍, 但颜色为黄色, 悬浮细胞明显少于第 6 组合。其他 10 种组合, 30 d 内增殖倍数均在 2 倍以下, 悬浮细胞的量极少或无。因此, 可以确定 12 种组合中以第 6 组合为最适的培养基配方。

通过 3 种培养基对愈伤组织增殖培养效果和 12 种培养基对细胞悬浮系建立效果的比较研究。结果表明: 虽然 $\text{MS}+\text{BA } 0.2 \text{ mg L}^{-1}+\text{2,4-D } 1.0 \text{ mg L}^{-1}+\text{KT } 1.0 \text{ mg L}^{-1}$ 在愈伤组织增殖培养中表现较差, 但利用该培养基进行太子参细胞悬浮培养的效果最好。而 $\text{MS}+\text{BA } 0.2 \text{ mg L}^{-1}+\text{2,4-D } 1.0 \text{ mg L}^{-1}$ 虽然对愈

表 1 不同激素对愈伤组织增殖的影响

Table 1 Effects of hormones on callusing subcultured on MS medium after 30 days

| 组别 Group | 培养基 Culture medium | BA (mg L ⁻¹) | 2,4-D (mg L ⁻¹) | KT (mg L ⁻¹) | 接种数(块) Number of inoculated clumps | 愈伤组织颜色 Colour | 增殖倍数(30d) Multiplication (times) |
|-------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---|------------------|--|
| 1 | MS | 0.2 | 1.0 | 0.0 | 20 | 淡黄色 Pale yellow | 10 |
| 2 | MS | 0.2 | 2.0 | 0.0 | 20 | 淡黄色 Pale yellow | 6 |
| 3 | MS | 0.2 | 1.0 | 1.0 | 20 | 深黄色 Deep yellow | 3 |

表 2 不同激素组合的培养液对悬浮细胞系建立的影响

Table 2 Effects of hormones on callus growth and cell number in suspension culture after 30 days

| 组别 Group | 培养基 Culture medium | BA (mg L ⁻¹) | 2,4-D (mg L ⁻¹) | KT (mg L ⁻¹) | 接种数(瓶) Number of inoculated flasks | 30d后 After 30 days | | |
|-------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---|-------------------------------------|------------------|---------------------------|
| | | | | | | 愈伤增殖倍数 Multiplication (times) | 愈伤组织颜色 Colour | 悬浮细胞量 Suspension cells |
| 1 | MS | 0.2 | 0.5 | 0.0 | 5 | 2 | 黄褐色 Yellow brown | 极少量 Very few |
| 2 | MS | 0.2 | 1.0 | 0.0 | 5 | 1.2 | 黄褐色 Yellow brown | 极少量 Very few |
| 3 | MS | 0.2 | 1.5 | 0.0 | 5 | 1 | 黄褐色 Yellow brown | 极少量 Very few |
| 4 | MS | 0.2 | 2.0 | 0.0 | 5 | 4.2 | 黄色 Yellow | 较多 Many |
| 5 | MS | 0.2 | 1.0 | 0.5 | 5 | 1 | 黄色 Yellow | 少量 Few |
| 6 | MS | 0.2 | 1.0 | 1.0 | 5 | 5 | 淡黄色 Pale yellow | 大量 A large number |
| 7 | MS | 0.2 | 1.0 | 1.5 | 5 | 1.3 | 褐色 Brown | 无 None |
| 8 | MS | 0.2 | 1.0 | 2.0 | 5 | 1 | 黄色 Yellow | 少量 Few |
| 9 | MS | 0.2 | 2.0 | 0.5 | 5 | 1.3 | 黄褐色 Yellow brown | 极少量 Very few |
| 10 | MS | 0.2 | 2.0 | 1.0 | 5 | 1.3 | 褐色 Brown | 无 None |
| 11 | MS | 0.2 | 2.0 | 1.5 | 5 | 1 | 褐色 Brown | 无 None |
| 12 | MS | 0.2 | 2.0 | 2.0 | 5 | 1.4 | 黄褐色 Yellow brown | 极少量 Very few |

伤组织增殖效果最好,但作为液体培养基进行细胞悬浮培养,其所表现的效果很差。可见,相同的激素配方在愈伤组织的增殖和细胞悬浮培养所表现出的效果相差很大。KT在愈伤组织培养过程中可能起抑制作用,而在太子参细胞悬浮培养表现出较好的促进效果。

2.1.3 悬浮细胞的生长动态

将从第 6 组 MS+BA 0.2 mg L⁻¹+2,4-D 1.0 mg L⁻¹+KT 1.0mg L⁻¹ 培养的太子参悬浮细胞以同样培养基继代培养。结果表明,太子参悬浮细胞在继代培养的 0-5 d 为迟滞期;5-13 d 为对数生长期;13-28 d 为直线生长期,在 28 d 左右可以达到最大生长量,可在这一时期进行最大生长量的测定;28 d 后为减慢期、静止期(图 1),可能是太子参次生代谢产物合成的高峰期,因此可在第 28 天后进行太子参皂苷单体的检出及太子参总皂苷的测定。

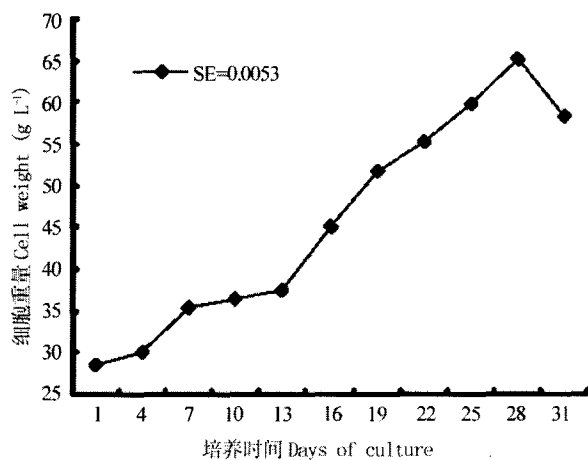


图 1 太子参悬浮细胞生长曲线

Fig. 1 Growth curve of suspension cells of *P. heterophylla*

2.2 皂苷单体的检测

太子参皂苷单体(如太子参皂苷 A)虽有报道^[3],

但目前并无标准对照品,本试验以人参皂苷 Rb1 标准样品作为参照品,采用高效液相色谱法检测各种试验材料中的太子参皂苷单体(图 2)。

两个太子参品种的参根、愈伤组织、细胞培养液 HPLC 色谱保留时间较为一致,且色谱峰与人参 Rb1 色谱峰接近,故可推断其可能为报道过的太

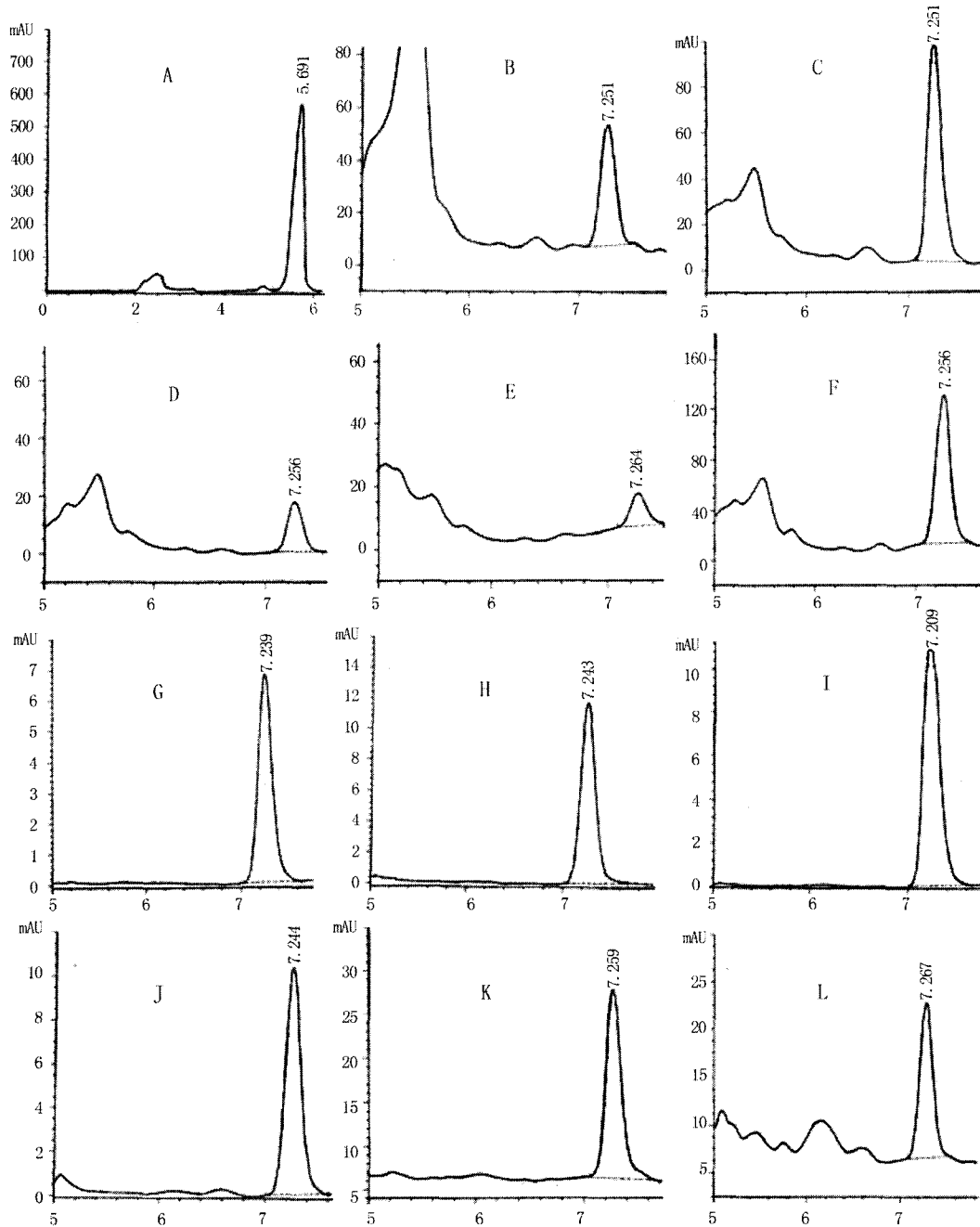


图 2 太子参皂苷 HPLC 检测色谱峰图

Fig. 2 HPLC chromatogram of saponin of *P. heterophylla*

A: 人参皂苷 Rb1 Ginsenoside Rb1; B: 柘参中号参根 From the roots of variety ZPM; C: 柘参大号参根 From the roots of variety ZPL; D: 茎尖苗参根 From the roots of plantlet obtained by culture of apical meristem (AMP); E: 愈伤苗参根 From the roots of plantlet by callus culture (CP); F: 种子苗参根 From the roots of seedlings (SP); G: 柘参中号愈伤组织 From calli of variety ZPM; H: 柘参大号愈伤组织 From calli of variety ZPL; I: 柘参中号悬浮细胞 From suspension cells of variety ZPM; J: 柘参大号悬浮细胞 From suspension cells of variety ZPL; K: 柘参中号培养液 From culture fluid of variety ZPM; L: 柘参大号培养液 From culture fluid of variety ZPL.

子参皂苷 A 色谱峰。常规种植及组培快繁植株所收获的参根有较多的杂质,因此在其太子参皂苷 A 色谱峰前后有较多的杂峰。而愈伤组织、细胞及培养液的太子参皂苷 A 色谱峰前后基本无杂峰,纯度较好。

2.3 太子参总皂苷含量的测定分析

2.3.1 不同材料的参根总皂苷含量比较

如图 3 所示,柘参中号、柘参大号、茎尖苗、愈伤苗、种子苗收获后的干燥块根产量分别为 200.00、200.00、311.85、317.10、61.53 (单位: $\text{kg } 667\text{m}^{-2}$)^[9]。而这 5 种不同参根的皂苷含量有明显的差别:柘参中号与柘参大号的皂苷含量较为接近,分别为 $3.63 (\pm 0.0227) \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ 和 $4.30 (\pm 0.0673) \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$,与张丽艳等所报道的柘荣太子参总皂苷 ($3.81 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$)^[10]基本相同;另 3 种组培苗的参根皂苷含量差异很大,茎尖苗 $3.05 (\pm 0.0130) \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ 、愈伤苗 $2.29 (\pm 0.0234) \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ 、种子苗 $6.68 (\pm 0.0364) \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ 。可见参根产量高的总皂苷含量反而低,各种不同材料的参根产量与其所含的总皂苷近似成反比。

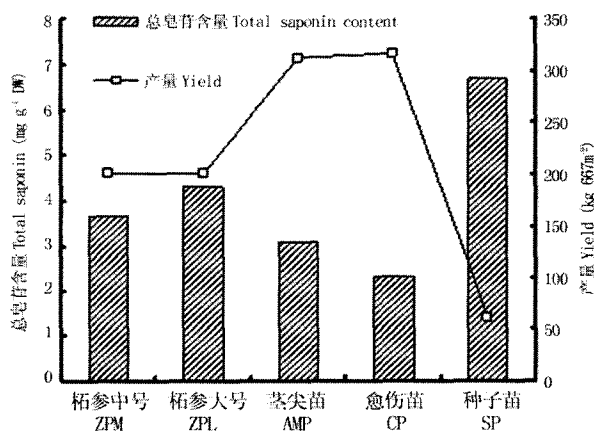


图 3 不同来源的参根总皂苷含量及产量比较

Fig. 3 Comparison of total saponin content and yield from roots of different sources

2.3.2 不同品种的愈伤组织块、细胞、培养液的总皂苷比较

分别取柘参中号、柘参大号的愈伤组织、细胞及其培养 2 g 干重细胞的培养液,经提取测定,柘参中号的 3 种不同来源的材料的皂苷含量分别为:愈伤组织 $0.67 (\pm 0.0148) \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ 、

细胞为 $0.98 (\pm 0.0096) \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ 和培养液为 $2.92 (\pm 0.0334) \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ 。柘参大号的 3 种不同来源的材料的皂苷含量分别为:愈伤组织 $1.01 (\pm 0.0166) \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ 、细胞为 $1.13 (\pm 0.0109) \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ 和培养液为 $2.13 (\pm 0.0109) \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ (图 4)。可见相同品种的愈伤组织、培养液内的细胞及培养液内的皂苷含量有明显的差别,不同品种的相同来源材料间的皂苷含量也有较大的差别。培养液中的总皂苷含量均比愈伤组织和细胞中的高。

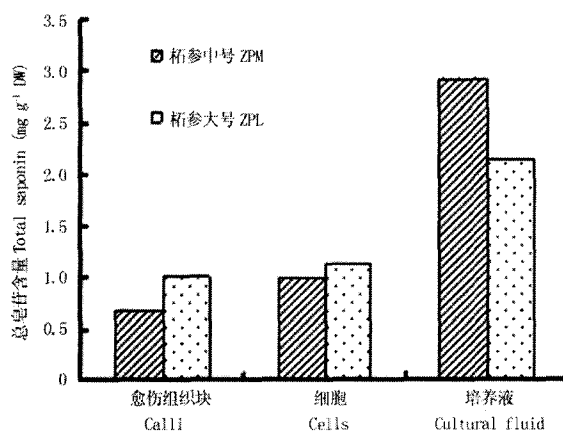


图 4 不同品种的愈伤组织块、细胞、培养液的总皂苷含量比较

Fig. 4 Comparison of total saponin content in calli, cells, cultural fluid of different varieties

3 结论

3.1 细胞悬浮系的建立

本试验通过嫩叶在 $\text{MS} + \text{BA } 0.2 \text{ mg L}^{-1} + 2,4\text{-D } 1.0 \text{ mg L}^{-1}$ 获得可进行多代增殖的愈伤组织。进而在 $\text{MS} + \text{BA } 0.2 \text{ mg L}^{-1} + 2,4\text{-D } 1.0 \text{ mg L}^{-1} + \text{KT } 1.0 \text{ mg L}^{-1}$ 液体培养基内进行悬浮培养,成功获得了太子参细胞悬浮系,并建立太子参悬浮细胞生长动态曲线:在 28 d 左右可以达到最大生长量。在培养的第 28–31 d 增殖生长减慢,可能是太子参次生代谢产物合成的高峰期。

3.2 皂苷单体的检出及总皂苷的测定

高效液相色谱分析表明经大田常规种植及组织培养快繁所获得的太子参参根、愈伤组织、液体培养的细胞、液体培养液内都检出与参根相同的皂苷色谱峰,且后三者所获得的皂苷纯度较好,说明利用细胞悬浮培养提取太子参皂苷是可行的。

对大田植株参根和组培苗参根的总皂苷进行比较,结果表明:茎尖苗、愈伤苗的参根内所含的总皂苷有所下降,特别是愈伤苗降低幅度较大,约为大田植株的一半。种子苗参根的总皂苷含量虽有较大幅度增长,但其产量低^[1],因此生产应用前景不好;茎尖苗参根虽然所含总皂苷量略低于大田植株但其较大田植株增产,因而还是有较好的应用前景。

对太子参愈伤组织、细胞、培养液内的总皂苷测定结果表明:细胞由于在液体流动培养环境中能较好地分泌出次生代谢产物,所以两种品种的太子参细胞所产生的总皂苷含量比其愈伤组织内的含量高 2 倍,且所增产的皂苷大都释放到培养液中。细胞在培养液内所释放的总皂苷含量(2.13–2.9 mg g⁻¹ DW) 略低于大田植株所收获的太子参块根内的总皂苷含量(3.6–4.3 mg g⁻¹ DW),与组培苗收获的太子参块根内的总皂苷含量(2.29–3.05 mg g⁻¹ DW) 相近。经 HPLC 检测结果表明,其皂苷纯度较好,杂质少,更便于开发利用。因此,利用太子参细胞悬浮培养,收获培养液即可提取质量较好的太子参总皂苷,经济价值高,有较大的产业化发展潜力。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典, Vol. 1 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 50.
- [2] Liu X H (刘训红), Chen B (陈彬), Wang Y X (王玉玺). Preliminary studies on pharmacological action of total saponins from Radix *Pseudostellariae* [J]. *Jiangsu Phar Clin Resea* (江苏药学与临床研究), 2000, 8(3):6–8. (in Chinese)
- [3] Wang Z X (王喆星), Xu S X (徐绶绪), Zhang G G (张国刚), et al. Studies on chemical constituents of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax (IV) [J]. *J Chin Medi Chem* (中国药物化学杂志), 1992, 2(3):65–67. (in Chinese)
- [4] Pan D R (潘大仁), Lin L Y (林龙云), Yang K H (杨可辉), et al. Study on the culture eliminating mosaic virus in *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax [J]. *J Fujian Agri For Univ* (福建农林大学学报), 2003, 32(8):194–198. (in Chinese)
- [5] Zhang M P (张美萍), Wang Y (王义), Luo W Y (罗维莹), et al. Callus culture and total saponin content determination of American Ginseng [J]. *J Jilin Agri Univ* (吉林农业大学学报), 1999, 21(1):46–48. (in Chinese)
- [6] Zhang M P (张美萍), Wang Y (王义), Sun C Y (孙春玉), et al. Effects of different media and some element components on growth and saponin content in *Panax quinquefolium* Linn. by callus suspension culture [J]. *J Plant Resour Envir* (植物资源与环境学报), 2003, 12(2):14–16. (in Chinese)
- [7] Xu Q (许茜), Wang H F (王红芳), Zhou X Y (周小羽). The optimum extraction conditions of saponin from *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax [J]. *Chin Trad Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(9):799–800. (in Chinese)
- [8] 国家药典委员会. 中国药典, Vol. 1 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 6–7.
- [9] Zhou Y F (周以飞), Lin L Y (林龙云), Pan D R (潘大仁), et al. Comparison of yields and amino acids between different virus-free tissue culture plantlets of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax [J]. *J Fujian Agri For Univ* (福建农林大学学报), 2004, 33(3):284–288. (in Chinese)
- [10] 张丽艳, 杨玉琴, 高言明. 贵州引种栽培太子参的品质分析 [J]. *中药材*, 2003, 26(7):479–480.