

雷公藤愈伤组织悬浮培养的研究

尹作鸿 朱蔚华

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook f.)为卫矛科雷公藤属植物,以根入药。药理实验表明,雷公藤具有明显的抗肿瘤、抗炎、免疫抑制以及抗生育作用^[1]。目前的研究结果表明,雷公藤二萜内酯类化合物是其主要的有效成分^[2,3]。雷公藤为多年生木质藤本,生长缓慢,临床上大量应用易使野生资源遭到破坏。因此,从70年代开始,日本、加拿大等国就进行雷公藤组织与细胞培养工厂化生产雷公藤内酯的研究^[4-6]。我们对雷公藤植物进行了细胞悬浮培养的研究:每升收获干培养物18.40g、二萜内酯9.184mg,并首次从培养液中分离出二萜内酯化合物。本文报道我们在这方面的研究结果。

材料与方 法

(一) 愈伤组织的诱导与细胞培养

1. 愈伤组织的诱导与优良无性系的筛选:取新长出的雷公藤茎作外植体,在添加2,4-D(1mg/L)、KT(0.1mg/L)的6,7-V固体培养基上诱导愈伤组织。将质地、颜色不同的愈伤组织分开培养,每次继代培养时去除混杂的愈伤组织,经5—6代,得到不同的无性系,测定各无性系的生长速度及二萜内酯含量并比较。其中,无性系D₁₂₁(y)的生长速度及二萜内酯含量均较高。无性系D₁₂₁(y)为棕黄色,颗粒状,失去了分化出根的能力,有利于液体培养。以下试验均采用D₁₂₁(y)为材料。

2. 细胞悬浮培养:将优良无性系D₁₂₁(y)在添加IAA(1mg/L)、2,4-D(1mg/L)、NAA(1mg/L)、KT(0.1mg/L)的6,7-V固体培养基上,于22±2℃下暗培养,继代三次后,将愈伤组织转接到分别加入IAA(1mg/L)、2,4-D(1mg/L)、NAA(1mg/L)的6,7-V液体培养基上进行振荡培养;22±2℃、旋转摇床转速为90r/

min。每隔14天转接一次,测定在不同生长素处理下培养细胞的鲜重,干重、生长速度、干燥率、培养物中二萜内酯含量及产量。

生长速度(g/L·d)

$$= \frac{\text{培养物收获鲜重(g/L)} - \text{接种材料鲜重(g/L)}}{\text{培养时间(d)}}$$

$$\text{干燥率(\%)} = \frac{\text{培养物收获干重(g)}}{\text{培养物收获鲜重(g)}} \times 100$$

3. 固体培养与液体培养的比较:在进行液体培养的同时,将愈伤组织转接到分别含IAA(1mg/L)、2,4-D(1mg/L)、NAA(1mg/L)的三种6,7-V固体培养基中培养,每隔35天转接一次,测定愈伤组织的鲜重、干重、生长速度、干燥率、二萜内酯含量、产量,将固体培养与液体培养的结果进行比较。

(二) 愈伤组织中二萜内酯的分析

1. 含量的测定:取新收获的培养物于75℃下烘干、碾碎。定量称取干培养物1g,用95%的乙醇回流提取8h。回收乙醇,残余物用CH₂Cl₂溶解、过滤。用2%的NaOH,1%的HCl分别洗CH₂Cl₂溶液,再用蒸馏水洗CH₂Cl₂溶液至中性。回收CH₂Cl₂,残渣用95%的乙醇定容至50ml。取定容的乙醇液2ml,加入新配的Kedde试剂2ml,再用95%的乙醇定容至10ml,用721分光光度计测吸光度(530nm)A: A = 6.854X + 0.028 (X为溶液中二萜内酯的重量,mg; r = 0.9999)。二萜内酯含量由下式计算:

$$C(1/10^5) = \frac{50 \times 10 \times (A - 0.028)}{2 \times 6.854 \times 1 \times 1000} \times 100000$$

本文于1990年9月29日收到。

中国医学科学院药理一室帮助做药理试验,植化室于德泉教授提供雷公藤甲素、雷公藤乙素标准品,特此致谢。

二萜内酯的产量(P)由下式计算:

$P = C \times M \times 1000$ (P 为二萜内酯的产量, mg/L; M 为每升培养基中所收获的干培养物重, g/L)

2. 培养液中二萜内酯产量的测定: 液体培养后, 用 200 目的尼龙网滤去细胞, 取培养液 Mml 用 CH_2Cl_2 提取至颜色极浅为止, 然后按上面的步骤处理、根据回归方程计算溶液中二萜内酯的重量 X, 然后再根据: $Y = 1000X/M$ 计算一升培养液中二萜内酯的产量(Y, mg)

3. 薄层层析: 采用自制的硅胶 G 板。展开剂: CH_2Cl_2 : $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ (25:1)。显色剂: 新配的 Kedde 试剂。

4. 柱层析: 采用 200 目硅胶, 洗脱剂: CH_2Cl_2 : 石油醚 (10:3); CH_2Cl_2 : $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ (30:1); CH_2Cl_2 : $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (50:2), 薄层检测、分段收集。

5. 药理试验: 经柱层析后分段收集的样品蒸干, 测定各样品对 KB 细胞的半数致死量。

结 果 与 讨 论

(一) 悬浮培养物的生长

固体培养的愈伤组织转接到液体培养基后, 由于通气及其他环境条件的改变, 悬浮培养的雷公藤组织在第一代时, 生长速度明显下降, 到第三代, 生长速度就明显高于固体培养下的组织。表 1 列出了第三代液体培养时培养细胞生长的情况。从中可以看出, 液体培养物在含 NAA 的培养液中生长最快 (11.93 g/L·d), 每升培养基上收获的干培养物产量最大 (18.40 g/L); 在含 IAA 的培养液中次之, 二者分别为 7.89 g/L·d、16.40 g/L; 在含 2,4-D 的培养液中生长最慢, 干培养物产量最低。这些结果与固体培养条件下, 不同生长素对组织与细胞生长的作用不完全一致 (见表 1)。考虑到细胞的生长情况, 进行雷公藤细胞悬浮培养时, 不应完全按照固体培养基的配方。

干燥率的测定结果表明: 含 2,4-D 的液体培

表 1 液体培养与固体培养条件下组织与细胞的生长

生 长 素	IAA		2,4-D		NAA	
	液体	固体	液体	固体	液体	固体
培养方式						
生长速度 (g/L·d)	7.89	4.33	6.24	7.64	11.93	5.53
干燥率 (%)	8.43	4.60	8.84	4.03	7.16	4.19
干重 (g/L)	16.40	8.35	14.20	12.00	18.40	8.92

培养基中, 培养物的干燥率最大 (8.84%); 含 IAA 的培养液中的次之 (8.43%); 含 NAA 的培养液中的最小 (7.16%)。这些结果均比固体培养条件下的干燥率大。这说明, 悬浮培养物中的含水量比固体培养物中的低。

从表 1 中还可以看出: 无论是在液体培养还是在固体培养中, 生长速度与干燥率都有很好的对应关系, 生长速度大的干燥率小。这表明, 培养的雷公藤组织与细胞生长快的, 吸水量也大。

在悬浮培养条件下, 用固体培养中产生的再生根作材料进行培养, 由于根较长, 经旋转摇床振荡培养一段时间后, 再生根卷成一团, 沉于瓶底, 因通气不良而死亡。即使在转接时将卷成团的再生根分开, 切断, 根的生长速度也很低, 而且将根分开、切断, 很不方便、容易污染。因此, 我们认为, 再生根不适于作液体悬浮培养

材料。

(二) 二萜内酯的产生与收获

在悬浮培养中, 培养物中二萜内酯的含量因培养基中加入的生长素种类而变化。其中, 含 NAA 的培养液中, 培养物中的二萜内酯含量达到 59.07/十万, 这是植物根中二萜内酯含量的 8.51 倍, 培养物中二萜内酯产量高达 6.414 mg/L; 含 2,4-D 的培养液中, 培养物中二萜内酯的含量与产量次之; 而含 IAA 的培养液中, 培养物中二萜内酯含量与产量最低。这也与固体培养条件下的结果不完全一致 (见表 2)。比较 IAA、2,4-D、NAA 这三种生长素的效果, NAA 无论是在固体还是在液体培养基中都对二萜内酯的积累有益。

通过测定发现, 培养液中也含有二萜内酯化合物, 而且产量较高。目前, 在含 NAA 的培养液中, 二萜内酯的产量高达 2.772 mg/L, 占二萜

内酯总产量的30.16%; 这样, 每升含NAA的液体培养基上共收获二萜内酯9.184mg, 相当于植物根中的12.19倍, 这一结果也远远高于固体培养条件下的0.869mg/L。如果能继续提高培养液中二萜内酯的产量, 则在雷公藤植物组织与细胞

培养工厂化生产雷公藤内酯的过程中, 可以采用只收集培养液的细胞连续培养或细胞固相化培养, 从而达到保存材料、节省成本的目的, 具有实际的应用价值和经济意义。

薄层层析的结果(图1)表明, 雷公藤组织悬

表2 液体培养中二萜内酯的收获及与固体培养的比较

生 长 素	液 体 悬 浮 培 养								固 体 培 养	
	培养物的 二萜内酯 的 含 量 (1/十万)	二萜内酯的产量						相当于原 植物根中 的 倍 数	二萜内 酯含量 (1/十万)	二萜内 酯产量 mg/L
		培养物中(Pt)		培养液中(Pm)		Pt + Pm				
		mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%			
IAA	18.60	2.212	56.86	1.678	43.14	3.890	100	2.68	5.24	0.438
2,4-D	27.72	2.695	62.94	1.587	37.06	4.282	100	3.99	3.27	0.392
NAA	59.07	6.414	69.84	2.772	30.16	9.184	100	8.51	9.74	0.869

浮培养物和培养液中, 均含雷公藤植物根中的有效成分——雷公藤甲素、雷公藤乙素等二萜内酯

化合物。这从定性的角度证明了雷公藤组织悬浮培养能产生雷公藤植物根中的药用成分。

(三) 药理试验结果

培养的雷公藤植物组织的三个提取物样品对KB细胞的半数致死量(ED_{50})分别为 $5\mu\text{g/ml}$ 、 $7.5\mu\text{g/ml}$ 、 $7\mu\text{g/ml}$ 。此试验结果表明, 悬浮培养的雷公藤组织有一定的细胞毒作用; 这从药理角度也初步证明悬浮培养物具有雷公藤植物根相似的药理作用。

由此看出, 在悬浮培养条件下, 雷公藤组织培养物的生长及二萜内酯的积累的适宜生长素种类与固体培养条件下的不完全一致。因此进行雷公藤组织悬浮培养时, 不能完全照用固体培养基, 而必须对其中的某些组分进行调整。从已有的试验结果来看, 在悬浮培养液中添加NAA的效果比添加IAA或2,4-D的好。在悬浮培养条件下, 培养物生长快、培养周期短(液体培养为14天, 固体培养为35天)、二萜内酯的含量与产量均比固体培养时高, 且培养液中也分泌有相当量的二萜内酯, 显示出比固体培养具有更多的优越性。本工作为雷公藤植物组织与细胞培养工厂化生产雷公藤二萜内酯类化合物的进一步深入研究奠定了有益的基础。

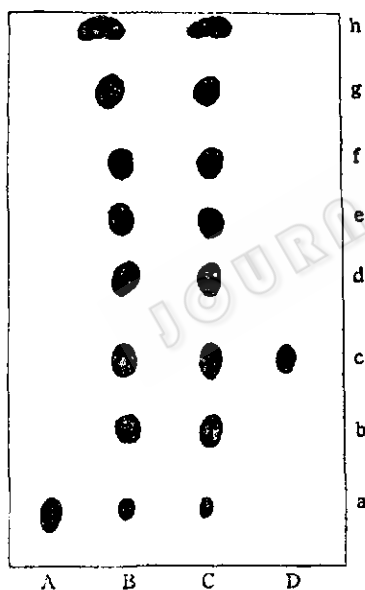


图1 雷公藤液体培养中产生的二萜内酯化合物(薄层层析图谱)

A. 雷公藤乙素标准品; B. 培养的组织与细胞;
C. 培养液 D. 雷公藤甲素标准品

(a. 雷公藤乙素; c. 雷公藤甲素; b, d, e, f, g, h: 没定名的二萜内酯化合物)

参 考 文 献

- [1] “全国中草药汇编”编写组编, 全国中草药汇编(下册), 第一版, 人民卫生出版社, 北京, p654, 1978.
- [2] 郑家润等, 中医杂志, 9:74—78, 1982.

- [3] 程自珍等: 中国医院药学杂志, 19(6):26—28, 1986.
[4] Kutney, J. P. et al.: *Planta Medica*, 48:158—163, 1983.
[5] Misawa, M. et al.: *Planta Medica*, 49:115—119, 1983.
[6] Kutney, J. P. et al.: *Can. J. Chem.*, 59:2678, 1981.

The Suspension Culture of *Tripterygium wilfordii*

Yin Zuohong Chu Weihua

(The Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

In suspension culture of *Tripterygium wilfordii*, 18.4mg/L drying cultures and 9.184mg/L diterpene-lactone compounds were obtained in 6,7-V medium containing 1mg/L NAA. Besides those in cultures, diterpene-lactone compounds were also found in the liquid medium and the yield reached 30.16—43.14% of the total yields. The total yield of diterpene-lactone compounds in suspension culture (6,7-V medium containing 1mg/L NAA) was 12.19 times as much as that in original plant roots. In addition, 3 specimens of diterpene-lactone compounds extracts from suspension cultures were toxic to KB cells. Compared with those in solid culture, less incubation time was needed and more diterpene-lactone compounds were produced in suspension culture.

Key words

Tripterygium wilfordii; suspension culture; solid culture; diterpene-lactone compound; growth rate