

## 人参寡糖素对三七悬浮培养细胞生长的效应\*

甘烦远 郑光植

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

5567.236

A

**摘要** 从人参培养细胞的细胞壁中分离纯化到不同分子量的单体人参寡糖素。试验结果表明命名为人参寡糖素Ⅱ和人参寡糖素Ⅲ的两种寡糖素对三七悬浮培养细胞的生长具有明显的促进作用, 其增长率分别为19.34%和10.58%, 人参寡糖素Ⅱ的适宜浓度为5—10mg/l。在高浓度下(大于25mg/l)稍抑制培养细胞生长。在细胞培养22天(指数生长期)后, 加入10mg/l的人参寡糖素Ⅱ, 然后再培养2天, 其生长速率即提高, 加入人参寡糖素Ⅲ后, 缩短了三七细胞悬浮培养生长的延缓期, 提前进入对数生长期和指数生长期, 并在对数生长期和指数生长期作用最明显, 因而最终收获时培养细胞的产率增加。

**关键词** 人参寡糖素; 三七; 细胞悬浮培养; 生长速率; 细胞产率

## EFFECTS OF GINSENG-OLIGOSACCHARINS ON THE GROWTH OF SUSPENSION CULTURE CELLS FROM PANAX NOTOGINSENG

Gan Fanyuan and Zheng Guangzhi

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

**Abstracts** Different kinds of pure single ginseng-oligosaccharins were isolated and purified from the culture cell walls of *Panax ginseng*. The study results found that the two of these oligosaccharins which were named ginseng-oligosaccharin Ⅱ and ginseng-oligosaccharin Ⅲ could significantly promote the growth rate (which increased by 19.34% and 10.58% respectively) of suspension culture cells from *Panax notoginseng*. The optimum concentration of ginseng-oligosaccharin Ⅱ on culture cell growth was 5—10 mg/l. But the culture cell growth was inhibited in a little case when its concentration was above 25 mg/l. The culture cell growth rate began to increase after added ginseng-oligosaccharin Ⅱ (10mg/l) in the suspension cells which had been incubating for 22 days (the growth was in the phase of exponential growth) for 2 days. After added ginseng-oligosaccharin Ⅲ, the phase of delay growth of suspension culture cells in the growth curve was reduced, so the phases of logarithmic and exponential growth were come in advance. The effects of ginseng-oligosaccharin Ⅱ on cell growth were most significant in the phases of logarithmic and exponential growth, so the yield of culture cells was increased in the harvest time.

**Key words** Ginseng-oligosaccharins; *Panax notoginseng*; cell suspension culture; growth rate; cell yield

\*国家“七五”攻关课题。

王世林同志提供寡糖素样品, 特此致谢。

寡糖素作为一类新的植物调节因子其生理作用已知有很多<sup>[1, 2]</sup>。对植物细胞培养而言, 它能提高植物培养细胞的生长及次级代谢产物的含量<sup>[3, 18]</sup>, 能提高马铃薯试管结薯数<sup>[5]</sup>, 能提高细胞平板培养的植板率<sup>[4]</sup>, 并且能影响烟草外植体的分化和形态发生<sup>[11]</sup>等等。对寡糖素的结构与功能及其关系的研究已取得了很大的进展<sup>[10]</sup>。

三七 (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) 是我国传统名贵中药, 其细胞工程学的研究已有很大进展<sup>[6, 7, 8]</sup>。虽然三七大量培养的细胞其皂甙含量已达 11.21%<sup>[7]</sup>, 远比栽培三七的高得多, 但其生长速率却一直较低, 特别是在悬浮培养过程中细胞容易成团结块, 甚至有分化根出现<sup>[9]</sup>, 严重影响了从愈伤组织到细胞大量培养的时间进程。加入寡糖素已证明能提高三七培养细胞的生长<sup>[6, 13]</sup>, 但使用的寡糖素是混合的, 并未分纯。本文在这些研究基础上, 对人参单体寡糖素对三七细胞悬浮培养的生长情况做了一些实验, 现报告如下。

## 1 材料与方方法

### 1.1 实验材料及培养方法

供试材料为已连续继代20代以上的愈伤组织无性系<sup>[8]</sup>, 愈伤组织每30天左右继代一次。培养基为每升附加2,4-D 2mg/l、KT 0.1mg/l, 椰子汁(CM) 10%的MS固体培养基, 每50ml三角瓶装20ml培养基, 26±1℃暗中培养。细胞悬浮培养的培养基及培养条件同上, 但去掉琼脂, 摇床转速120rpm, 每250ml的三角瓶中装50的液体培养基。培养时间除注明外均为30天。每处理至少3次重复, 结果取其平均值。

### 1.2 细胞的产率及生长速率测定

三七悬浮培养的细胞收获后, 过滤, 水洗3次, 冰冻干燥至恒重, 称重后按每天每升培养基生长的细胞干重数作为细胞的生长速率(g/l.day), 另外, 以培养细胞净增干重除以培养体积(g/l)作为培养细胞的产率。

### 1.3 寡糖素的制备及用法

人参寡糖素是由人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)培养细胞的细胞壁制备而来, 单体寡糖素是通过各种方法纯化得到。人参寡糖素使用时与培养基一起高压灭菌。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同人参寡糖素对三七悬浮培养细胞的影响

经纯化后, 从人参培养细胞中制备得到不同分子量的人参寡糖素, 从中筛选了几种寡糖素进行试验。结果见表1。

表1 不同人参寡糖素对三七悬浮培养细胞生长的影响

人参寡糖素	浓度(mg/l)	生长速率(g/l.day)	细胞产率(g/l)
VI	10	0.289	8.66
VII	10	0.327	9.80
VIII	10	0.303	9.10
对照(control)	0	0.274	8.22

试验结果表明,Ⅶ和Ⅷ两种人参寡糖素均能促进三七悬浮培养细胞的生长,其增长率分别为19.34%和10.58%,人参寡糖素Ⅶ效果不佳,证明了寡糖素的结构不同,其生理作用亦不同。

## 2.2 不同浓度人参寡糖素Ⅶ对三七悬浮培养细胞生长的影响

在此基础上,对促进三七培养细胞生长作用效果较好的人参寡糖素Ⅶ进行了不同浓度的试验(图1),试图找出寡糖素作用的最适浓度。结果表明,人参寡糖素Ⅶ促进三七悬浮培养细胞生长的适宜浓度是5—10mg/l,在此浓度范围内的增长幅度为13—20%左右。浓度大于25mg/l时,对细胞生长有轻微抑制作用。前文我们曾报道<sup>[6]</sup>,混合人参寡糖素在三七细胞悬浮培养中的适宜浓度为15mg/l,可见混合寡糖素进一步分纯后,其作用浓度要降低。而比起愈伤组织培养<sup>[12]</sup>,其适宜浓度就显得更低了。

## 2.3 人参寡糖素Ⅶ对三七悬浮培养细胞生长的作用时间

三七细胞悬浮培养22天后(此时细胞处于生长的指数期),加入10mg/l的人参寡糖素Ⅶ,然后每隔2天测定1次细胞的生长,并设空白对照,结果见图2。结果发现,加入寡糖素后再培养2天,细胞的生产产率即明显提高(提高大约13%),并且随培养时间的延长,生物量显著增加,到正常收获时间(即加入寡糖素后再培养8天),其生长率提高了21.05%。证明寡糖素对培养细胞生长的促进作用的时间很短。

## 2.4 人参寡糖素Ⅶ对三七细胞悬浮培养过程的影响

为了观察人参寡糖素Ⅶ对三七细胞培养整个过程的生理影响,在细胞培养的第1天同时加入10mg/l的人参寡糖素Ⅶ,另设空白对照。结果发现(图3),在三七细胞悬浮培养的延缓期内(培养时间10天之前),人参寡糖素即具有明显的促进作用,第5天时即开始促使三

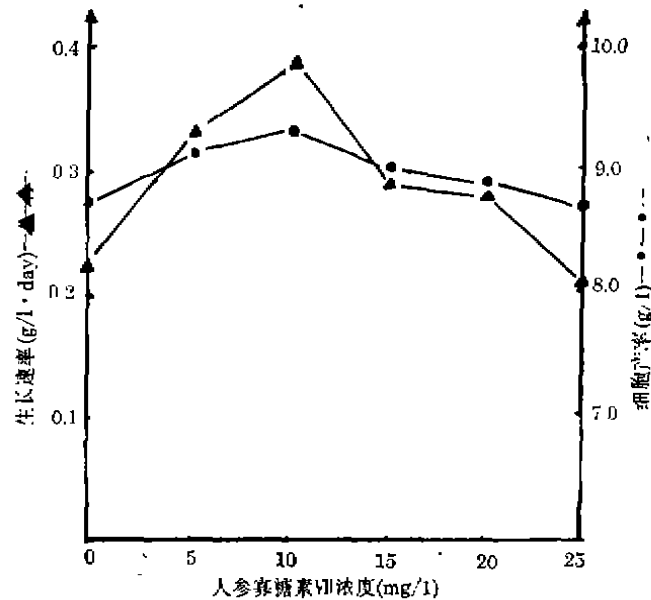


图1 不同浓度人参寡糖素Ⅶ对三七悬浮培养细胞生长的影响

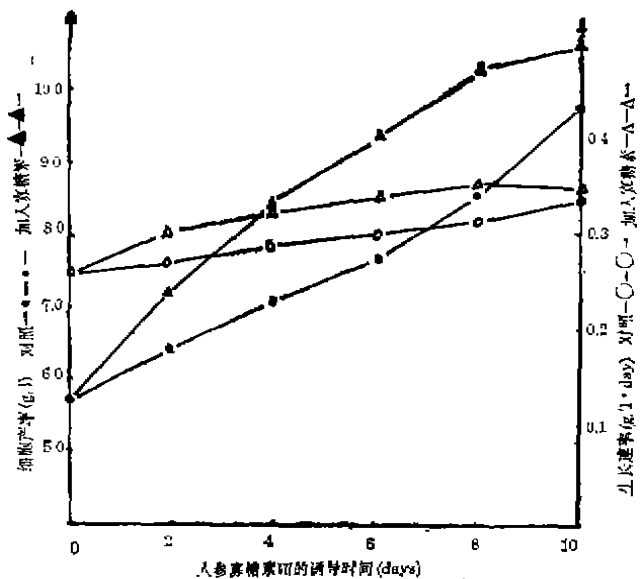


图2 人参寡糖素对三七悬浮培养细胞生长的作用时间

三七细胞大量分裂, 进入对数生长期, 并在这个时期及随后的指数生长期作用最明显(培养时间25天之前), 在这个阶段, 细胞的产率最少也能增加46%以上。进入细胞生长稳定期后, 寡糖素的作用不很大, 细胞产率的增加主要是前期细胞生长增加的累积。

在细胞平板培养(或叫单细胞培养)和普通细胞培养过程中, 往往在初始细胞密度低的情况下, 细胞生长很慢或根本不生长, 其原因是细胞在培养时首先要适应培养基环境。细胞一方面从培养基中吸取营养成分, 同时也向培养基中释放细胞内代谢物, 只有当细胞内源代谢物达一定阈值, 才能诱导细胞生长和分裂。当细胞密度较低时, 这一阈值很难达到, 造成细胞低密度培养在没有特殊条件下很难成活。细胞培养过程中存在的生长延缓期也就是这个缘故。现在的研究表明细胞本身能产生一些物质因子进而调节细胞生长和分裂这些因子对低密度细胞克隆或培养的诱导促进作用非常明显有报道认为, 这些因子可能是一类寡糖物质<sup>[12]</sup>。我们早期的报道<sup>[4]</sup>及现在的实验结论都间接地证实了这种假设。

人参寡糖素对三七悬浮培养细胞生长的促进作用是很明显的。从应用来看, 我们希望人参寡糖素能对栽培三七或其它的栽培植物的生长起到促进作用, 而这一点是有根据<sup>[10]</sup>并且是很有可能。

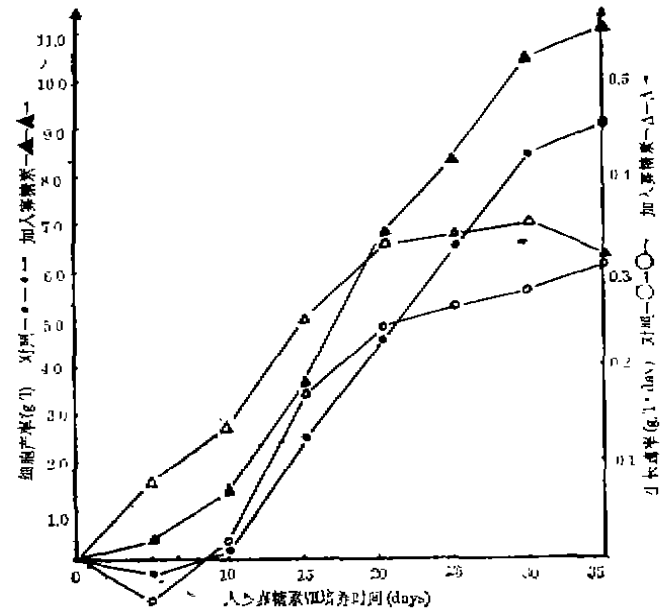


图3 人参寡糖素对三七细胞悬浮培养过程的影响

细胞克隆或培养的诱导促进作用非常明显有报道认为, 这些因子可能是一类寡糖物质<sup>[12]</sup>。我们早期的报道<sup>[4]</sup>及现在的实验结论都间接地证实了这种假设。

人参寡糖素对三七悬浮培养细胞生长的促进作用是很明显的。从应用来看, 我们希望人参寡糖素能对栽培三七或其它的栽培植物的生长起到促进作用, 而这一点是有根据<sup>[10]</sup>并且是很有可能。

## 参 考 文 献

- 1 王克夷. 寡糖素——一类新的植物调节分子. 植物生理学通讯, 1989, (4): 56—58.
- 2 何才平. 植物细胞壁寡糖素的生理功能. 细胞生理杂志, 1990, 12(2): 64—67.
- 3 甘炳远, 郑光植, 王世林等. 诱导子人参寡糖对红花培养细胞的生理效应. 植物学报, 1992, 34(3): 208—213.
- 4 周平, 郑光植. 红花细胞克隆的平板培养. 植物学报, 1989, 31(7): 505—511.
- 5 陈善娜, 李琼红, 王丽华等. 香豆素和寡糖素对马铃薯试管结薯的影响. 云南植物研究, 1991, 1(3): 321—326.
- 6 周立刚, 郑光植, 甘炳远等. 三七细胞悬浮培养的研究. 植物学报, 1992, 34(8): 609—613.
- 7 周立刚, 郑光植, 王世林等. 三七细胞大量(发酵)培养的研究. 植物学报, 1992, 34(3): 76—80.
- 8 郑光植, 王世林. 三七愈伤组织的培养. 云南植物研究, 1989, 11(3): 255—262.
- 9 郭枫, 王爱琴, 胡之璧等. 三七的组织培养和细胞培养. 植物生理学通讯, 1992, (1): 45—47.
- 10 Albersheim P., Darvill A. C. Oligosaccharins. Scientific American, 1985, 253(3): 44—50.
- 11 Darvill A. G., Dollin D. J., Chelf P. et al. Manipulation of the morphogenetic pathways of tobacco explants by oligosaccharins. Nature, 1985, 314: 615—617.
- 12 Somers D. A., Birnberg P. R., Petersen W. L. et al. The effects of conditioned medium on colony formation from Black Mexican Sweet' corn protoplasts. Plant Science, 1987, 53(3): 249—256.
- 13 Zhou L. G., Zheng G. Z., Wang S. L. et al. Effects of oligosaccharins on callus growth and saponin content of *Panax notoginseng*. Cell Research, 1992, 2: 83—87.