

锗载体导入人参培养细胞的研究*

蒋 晶 王敬文

摘要 野山参在数十年的生长期中富集了大量的锗, 药效显著。人参培养细胞吸收和积累的锗量很少, 约8~17 ppm。制备了对细胞无损害的载体化合物VA、VB和VC, 利用载体把锗导入人参培养细胞, 培养周期28 d, 载体VA、VB导入的锗量分别达到2978 ppm和483 ppm。人参富集锗是成熟细胞的功能, 在细胞培养的对数期末载体供锗是合理的。供锗培养不影响培养细胞人参皂甙的生物合成和积累。

关键词 人参、锗、载体导入

锗元素对人体生理的作用和含锗制剂对人们健康的功能在医药卫生界已引起广泛的重视, 富集锗的生物制品也已进入生活领域。人参、灵芝、枸杞等名贵中药除各自含有独特的药化成分外, 其共同点是都富集锗。尤其人参, 野山参与栽培参不仅价格悬殊, 野山参的功效也比栽培参高得多, 然而二者的人参皂甙等成分的含量和组成大致近同, 可见野山参还含有栽培参所缺少的具有高度生理活性的成分, 国外学者研究认为, 就在于野山参细胞合成和积累了大量的有机锗化合物^[1,2]。在自然界, 植物包括人参吸收和积累锗是相当缓慢而长期的过程, 往往需要几年、几十年甚至更长时间才能积累到显示生理活性的水平。据张树功等¹⁾研究, 一般栽培人参中锗的含量均不超过0.1 ppm, 在田间进行的富集锗栽培试验中, 经2年富锗处理的人参锗含量只达到3~4 ppm, 可见单纯通过富锗栽培很难获得浅井一彦^[2]报道的含数百ppm的富锗人参。

本项研究应用现代生物技术, 进行人参细胞培养, 研制相应的化学载体, 把锗载入人参培养细胞, 进行代谢调节和控制, 使人参细胞大量吸收锗, 生物合成和积累大量有机锗化合物, 使培养的人参细胞具有近似野山参的功效。

1 材料和方法

1.1 试验材料

人参(*Panax ginseng* C.A. Mey)种子购自黑龙江省宁安县江山桥实验林场。干燥种子用1000 ppm GA₃水溶液20℃浸种72 h, 然后埋藏于湿砂中18~20℃催芽约45 d, 种子裂口后在砂盘中18℃继续发芽, 待苗长到6~8 cm高时取幼茎作为接种材料, 按蒋晶等^[3,4]法诱导和培养愈伤组织。选取松脆的愈伤组织制备悬浮细胞。

1993-02-15收稿。

蒋晶助理研究员, 王敬文(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400)。

* 国家自然科学基金资助项目。

1) 张树功, 李焕荣. 高锗人参及其药理活性研究. 全国锗的研究和利用学术会议论文与摘要集, 1992.

1.2 人参细胞悬浮培养

将疏松的人参愈伤组织团块放入灭菌的改良 MS 培养液中, 再加入经超滤灭菌的果胶酶(自制), 使酶浓度为 0.5 % (W/V), 调节 pH 至 4.5, 30 °C 保温约 45 min, 经振摇后愈伤组织块分散为单细胞和小细胞团, 用 120 目尼龙滤布滤去较大细胞团, 经离心沉降洗涤后重新悬浮于 MS 培养液中, 在显微镜下计数每毫升细胞数, 10 个细胞以下的细胞团按单细胞计数, 然后接种到培养瓶中, 使细胞起始密度不小于 10^5 个/ml 种, 培养液中蔗糖浓度为 2 %, 2,4-D 浓度为 0.5 mg/L, 培养温度为 20~25 °C, 每分钟往复振荡 90 次, 定期观测细胞的生长量。

1.3 供锗培养

由南京锗厂购来高纯二氧化锗(含量 > 99.99 %), 再由二氧化锗合成锗酸钠、醋酸锗、柠檬酸锗、酒石酸锗和羧乙基锗倍半氧化物 $[(\text{GeCH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2\text{O}_3, \text{Ge-132}]$, 分别按不同浓度加入改良 MS 培养液中, 使其浓度(以 Ge 计)分别为 5、10、50、100、200 ppm, 经灭菌后接种人参细胞, 细胞起始密度为 10^5 个/ml, 在最适条件下进行振荡培养, 定期取样观测, 质壁分离法^[6]计数死亡细胞数。

1.4 锗的测定

参照陆龙根等²⁾方法。

1.5 人参皂甙的测定

参照逢焕诚^[6]法。

2 研究结果

2.1 人参培养细胞的生长曲线

在改良的 MS 培养液中进行人参细胞悬浮培养, 培养液蔗糖浓度为 3 %, 2,4-D 浓度为 1 mg/L, 在室内自然光和 20~25 °C 下振荡培养, 每分钟往复振荡 90 次, 每两天取样测定培养液细胞密度, 其结果如图 1 所示。

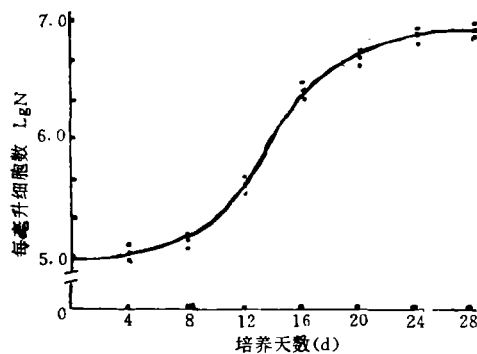


图 1 人参悬浮培养细胞生长曲线

2.2 2,4-D 浓度对细胞生长和皂甙含量的影响

在培养液中添加植物激素, 实验表明所试验过的几种激素中只有 2,4-D 对人参培养细胞的增殖和人参皂甙的生物合成有密切的关系。在无 2,4-D 培养液中人参细胞增殖缓慢, 人参皂甙含量很低; 随着培养液中 2,4-D 浓度的增高, 皂甙含量也随之增高。当 2,4-D 浓度达到 2 mg/L 时, 尽管细胞增长量有所减弱, 而人参皂甙含量仍有增加。实验结果表明, 使人参培养物获得最大生长量和最高皂甙含量的最适 2,4-D 浓度为 0.5~1.0 mg/L (表 1)。

2.3 各种锗化合物对人参细胞生长的影响

培养液中分别加入各种形式的锗化合物, 其浓度(以 Ge 计)为 0、5、10、50、100、200 ppm, 在最适条件下进行人参细胞悬浮培养。不同形式的锗化合物对人参细胞表现出不同的毒害作用, 尤其二氧化锗对人参细胞有较大的毒害作用, 10 ppm 细胞生长受阻, 50

2) 陆龙根, 钱亚玲, 吴立仁. 回流下酸硝化和萃取比色测定大蒜中锗. 全国第一届锗研讨会资料汇编, 1990.

表1 2,4-D浓度对人参培养细胞生长和皂甙含量的影响

| 2,4-D 浓度 (mg/L) | 0 | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 3.0 |
|-----------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| 细胞生长量(IgN) | 5.45 | 5.83 | 6.04 | 6.22 | 6.54 | 6.82 | 6.53 | 6.17 |
| 人参皂甙含量(%) | 0.14 | 0.62 | 2.26 | 6.83 | 14.72 | 17.13 | 19.06 | 16.77 |

ppm 细胞大批死亡, 细胞培养物生长量为对照的44.7%。锆酸钠、醋酸锆、柠檬酸锆、酒石酸锆在其浓度小于10 ppm 时对细胞生长略有促进, 大于10 ppm 就抑制细胞生长。羧乙基锆倍半氧化物(Ge-132)是一种有机锆化合物, 在0~200 ppm 浓度范围内, 对细胞生长略有促进, 结果如表2。

表2 各种锆化合物对人参培养细胞生长的影响

(单位: %)

| 锆化合物浓度 (ppm) | 0 | 5 | 10 | 50 | 100 | 200 |
|--------------|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| 二氧化锆 | 100 | 94.6±2.7 | 82.3±1.8 | 44.7±4.2 | — | — |
| 锆酸钠 | 100 | 106.3±1.6 | 102.6±2.1 | 92.2±1.8 | 87.2±3.3 | 66.4±2.9 |
| 醋酸锆 | 100 | 108.7±3.2 | 104.4±2.6 | 93.4±3.6 | 86.4±2.8 | 61.7±4.6 |
| 柠檬酸锆 | 100 | 112.4±3.6 | 108.3±2.8 | 94.2±2.6 | 82.5±3.2 | 59.2±4.3 |
| 酒石酸锆 | 100 | 105.3±2.8 | 102.4±3.2 | 94.6±4.3 | 88.3±2.5 | 62.7±3.7 |
| 羧乙基锆倍半氧化物 | 100 | 114.4±4.2 | 117.3±3.8 | 108.8±2.6 | 102.6±3.2 | 98.6±4.5 |

2.4 人参培养细胞对锆的吸收和积累

将锆酸钠、醋酸锆、柠檬酸锆、酒石酸锆和羧乙基锆倍半氧化物分别加入MS培养液中, 使其浓度为100 ppm, 在最适条件下进行悬浮培养, 细胞生长周期(28 d)结束后, 离心沉降细胞培养物, 用0.2 N NaCl 溶液离心洗涤3次, 然后烘干至恒重, 按陆龙根法²⁾测定细胞培养物的锆含量。于悬浮培养的同时, 还进行了固相培养人参愈伤组织吸收和积累锆的试验, 供锆浓度为100 ppm, 培养时间为28 d。人参培养物吸收和积累锆的数量如表3。

表3 人参培养物对不同形式的锆的吸收和积累

(单位: ppm)

| 培养物种类 | 锆酸钠 | 醋酸锆 | 柠檬酸锆 | 酒石酸锆 | 羧乙基锆倍半氧化物 |
|-------|----------|----------|----------|---------|-----------|
| 固相培养 | 6.2±1.4 | 8.8±2.1 | 10.2±1.6 | 5.4±1.3 | 13.6±2.7 |
| 悬浮培养 | 10.7±1.8 | 13.3±2.3 | 14.3±1.8 | 8.5±1.7 | 17.8±3.6 |

注: 非供锆培养(对照)人参培养物中的锆含量为0~0.01 ppm。

2.5 锆载体导入人参培养细胞

为了增加培养细胞对锆的吸收和积累, 减少无机锆对细胞的毒害作用, 增加细胞培养物的生物量, 制备了3种化合物VA、VB和VC作为锆化合物的载体, 将锆导入人参培养细胞。试验证明, 这3种载体化合物对细胞是无毒害作用的, 进入细胞后可以被细胞代谢降解, 不影响培养细胞的正常生长(表4)。将锆酸钠以1:2摩尔数与VA、VB、VC分别混合后, 在酸性条件下进行结合反应, 然后按不同的锆浓度配入细胞培养液中。实验表明, 锆与载体结合后, 细胞对锆的吸收是个主动吸收过程, 从而富集更多量的锆。在这种情况下, 供

锗浓度是次要的, 细胞富集锗的量取决于细胞生理状态和载体的理化性质(表 5)。

表 4 载体化合物种类和浓度对人参培养细胞生长的影响 (单位: %)

| 载体化合物 种 类 | 浓 度 (mM) | | | | |
|--------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| | 0 | 10 | 50 | 100 | 200 |
| VA | 100 | 102±3.7 | 100.0±4.3 | 103.3±2.8 | 98.7±4.7 |
| VB | 100 | 99.2±4.2 | 102±2.8 | 100.6±4.6 | 104.2±4.8 |
| VC | 100 | 103±2.6 | 98.4±3.6 | 102.3±3.5 | 97.7±5.2 |

表 5 各载体化合物在不同供锗浓度下对人参培养细胞积累锗的作用 (单位: ppm)

| 载体化合物 种 类 | 浓 度 (ppm) | | | | |
|--------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 5 | 10 | 50 | 100 | 200 |
| VA | 521.7±88.7 | 1 720.8±162.6 | 2 978.8±152.6 | 2 917.7±129.2 | 2 884.6±133.4 |
| VB | 74.4±13.4 | 182.3±21.8 | 286.3±29.2 | 317.3±33.5 | 322.4±46.2 |
| VC | 151.6±26.6 | 332.7±53.3 | 483.7±81.6 | 477.4±67.3 | 464.7±78.7 |

注: 非供锗培养(对照)人参培养物中的锗含量为 0~0.01 ppm。

2.6 培养细胞不同生长期对锗的吸收和积累

尽管人参细胞能够吸收和积累锗, 但尚未证实锗是人参细胞生长的必需元素。人参悬浮细胞培养周期约 28 d, 大致可划分 4 个阶段, 即滞缓期, 约 4~6 d; 增长期, 约 7 d; 对数期, 约 10~12 d; 休止期, 约 4~5 d。分别在各个阶段开始时添加与载体 VA 结合的锗酸钠 100 ppm, 培养周期结束后测定细胞培养物的含锗量, 结果表明, 分别在各个生长阶段供锗都能够达到最大富集锗量(表 6)。

表 6 不同时间供锗对人参培养细胞积累锗的影响 (单位: ppm)

| 开始供锗时间 | 第 1 天 | 第 6 天 | 第 12 天 | 第 23 天 |
|--------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 锗 含 量 | 2 892.4±133.7 | 2 978.3±146.7 | 2 907.6±183.3 | 2 880.4±156.6 |

2.7 供锗培养对人参细胞皂甙含量的影响

在培养液中添加不同剂量的锗酸钠, 在最适条件下进行人参细胞悬浮培养, 培养周期结束后分析细胞培养物人参皂甙的含量, 实验结果(表 7)表明, 供锗培养包括载体供锗培养不影响人参细胞中的皂甙含量。

表 7 供锗培养与人参培养细胞中皂甙含量 (单位: %)

| 锗 浓 度 (ppm) | 0 | 5 | 10 | 50 | 100 |
|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 锗 酸 钠 | 14.6±1.8 | 15.6±0.6 | 14.1±1.7 | 15.2±1.3 | 14.3±1.9 |
| VA+ 锗酸钠 | 15.2±1.2 | 14.2±1.8 | 16.1±0.7 | 15.6±0.8 | 14.8±1.7 |

注: 培养液中 2,4-D 浓度为 0.5 mg/L。

3 讨 论

野山人参、灵芝、枸杞等药效很强,保健功能卓著,它们的共同点是都能富集大量的锗。锗在地球上为稀有元素,由于其化学性质,植物富集锗是个长期而缓慢的过程,这些名贵中药材只是在野生环境条件下才能富集多量的锗。在人工栽培条件下,由于生长期短,栽培土壤中由于常年耕作锗很贫乏,因而植物富集的锗量低微,药效也随之减弱。由于植物富集锗是个长期而缓慢的过程,锗又是一种稀有的贵重元素,试图在栽培条件下通过施锗肥而达到富集锗的目的,从经济上考虑是行不通的。利用现代生物技术,通过培养细胞在短时间内富集大量的锗,通过代谢调节提高药化成分的含量,在人工条件下获取具有野生药材功效的制品,将可获得巨大的经济效益。

野山参含锗量约767 ppm^[1],栽培参含锗量约为0.1 ppm,施锗肥的栽培参含锗量约3~4 ppm^[1]。供锗培养的人参细胞培养物含锗量约8~18 ppm(表3),仍远低于野山参含锗量。本研究采用载体将锗导入人参培养细胞,在28 d的培养周期内富集锗量达到2 978 ppm(表5),比浅井一彦报道的野山参含锗量高约2.87倍。人参细胞培养物的人参皂甙含量,通过培养液组分的变化进行代谢调节,也显著提高(约16%),比栽培参(约4%)高约3倍。实验研究证明,人参细胞培养物富集的锗在细胞中不是以离子状态游离存在的,而是与多糖、皂甙等成分结合着的。有关锗在人参细胞中存在的形式以及其对药效的作用,另文报道。

锗对于人参生长发育不是必需的,在土壤中或非载体供锗培养的人参细胞培养液中,主要靠顺着化学势的扩散作用进入人参细胞,由于锗是以无机离子形式进入细胞,在锗浓度较高时对细胞产生毒害作用。锗与载体化合物结合后可以稳定结构元素^[7],锗上的电荷可以中和,因而能够把锗带入膜脂相达到原来不能达到的浓度。锗离子反应活性特别是其氧化势,由于通过载体配合基的变化而受到广泛的调节。载体化合物VA、VB和VC的稳定性以及通过携带向心配位体的变化而引起的稳定性的改变,使得锗能够在细胞中得以大量富集。锗从培养液中逆着化学势梯度进入细胞,这是一种主动运输、吸收的过程,使得细胞中积累锗的浓度高出培养液中的浓度近30倍。本研究中制备的载体化合物对人参细胞是没有毒害的,是可以被细胞代谢和利用的。

人参细胞生物合成皂甙,和吸收、转化、积累锗是相对独立的代谢过程(表7),可以通过不同的方式进行调节和控制。人参皂甙的合成与植物激素的水平紧密相关,尤其2,4-D对皂甙的生物合成有直接的调控作用^[4]。利用现代生物技术,进行人参组织和细胞培养,通过代谢调节和控制,能够获得药效成分含量高的具有野山参功效的产品,具有重要的经济价值。

参 考 文 献

- 1 浅井一彦.ゲルマニウムとわが人生.东京:玄同社,1969.
- 2 森下敬一.ゲルマニウムと健康.东京:神谷株式会社出版,1985.
- 3 蒋晶,王敬文.人参组织和细胞培养的研究II.影响愈伤组织中人参皂甙生物合成的因素.林业科学研究,1989,2(2):198~201.
- 4 蒋晶,王敬文.人参组织和细胞培养的研究I.环境因子对人参愈伤组织生长的影响.林业科学研究,1988,1(6):681~687.

- 5 薛应龙. 植物生理学实验手册. 上海: 科技出版社, 1989.
- 6 逢焕诚. 人参. 北京: 科学普及出版社, 1986.
- 7 Price C A. Molecular Approaches to plant physiology. McGraw-Hill Book Company, New York, 1970.

Study on Introduction of Germanium into Panax ginseng Cultured Cells via Chemical Vectors

Jiang jing Wang Jingwen

Abstract A great quantity of germanium was abounded in wild *Panax ginseng* during its growing period for decades, and its medical effects were very strong. The content of germanium absorbed and accumulated in *Panax ginseng* cultured cells was about 8~17 ppm. Chemical vector compounds VA, VB, and VC of free toxicity for cells were prepared, and germanium was introduced into *Panax ginseng* cultured cells through using these vectors. During a growth period of 28 days, the quantity of germanium introduced via VA, VB, or VC attained upto 2978, 286, and 483 ppm respectively. Abound of germanium in *Panax ginseng* was a function of mature cells. Superaddition of germanium via vectors was reasonable at the end of logarithm period. Superaddition of germanium in culture had no influence on biosynthesis and accumulation of *Panax ginseng* saponin.

Key words *Panax ginseng*, germanium, vector introduction

Jiang jing, Assistant Professor, Wang Jingwen (The Research Institute of Subtropical Forestry, CAF Fuyang, Zhejiang 311400).