

# 細胞培養系統生產絞股藍皂苷之研究<sup>1</sup>

陳盈君<sup>2</sup>、郭肇凱<sup>2</sup>、張隆仁<sup>2</sup>

## 摘 要

絞股藍為葫蘆科絞股藍屬植物，絞股藍皂苷(gypenosides)則是其重要活性成份之一。本研究完成建立絞股藍皂苷測定流程，並於1種本地採集材料測得絞股藍皂苷成份。在組織培養方面，葉片培植體培養於含有0.2~1.0 mg/l picloram之培養基皆有癒傷組織生成，0.2 mg/l picloram與低濃度BA (0~1 mg/l)組合之培養基同時有不定根生成。癒傷組織繼代培養於含有5 mg/l BA及0.2 mg/l picloram之基礎培養基，一個月後其鮮重增加約2.57倍，癒傷組織呈現黃白色、緊實之型態。液體培養至第7~10天後細胞量不再增加，細胞內容物充實，且細胞呈現團聚現象。

**關鍵字：**絞股藍、七葉膽、絞股藍皂苷、癒傷組織、細胞培養。

## 前 言

絞股藍為葫蘆科絞股藍屬植物，學名為*Gynostemma pentaphyllum* (thunb.) Makino，又名七葉膽、五葉參，同屬植物在全世界約有16種與3個變種，廣佈於中國大陸秦嶺及長江以南地區，印度、馬來西亞、菲律賓、日本、韓國及台灣皆有分布<sup>(11,12,15)</sup>。台灣絞股藍則於平地至海拔3,000 m之陰涼地區皆有分布<sup>(18)</sup>。

絞股藍之根莖或全草皆可入藥，其性味為甘、微苦、微寒，主要功效為清熱解毒、止咳化痰、養心安神。近年來國內外學者共分離出80多餘種皂苷，統稱為絞股藍皂苷(gypenosides)，其中絞股藍皂苷III、IV、VIII、XII分別與人參皂苷Rb1、Rb3、Rd、F2相同，故有南方人參之稱<sup>(16,24)</sup>。絞股藍除了絞股藍皂苷外，亦含有胺基酸、微量元素、黃酮、多醣、萜類與生物鹼等成份。藥理學研究指出絞股藍具有降血糖、降血脂、抗血栓、抗氧化、抗血小板聚集、保肝及提高免疫能力等作用<sup>(4,5,9,12,14,17,24)</sup>。絞股藍皂苷的測定方法可應用TLC、管柱分離與厚片層析(PLC)等分離後之純化產物，再利用精密儀器紅外線光譜儀進行特別官能基判定並以MS推測合理之分子量<sup>(3)</sup>。另外，利用分光光度法測定絞股藍皂苷之方法亦多有報導，此法操作較為簡便，不需貴重儀器，但無法針對特定成份進行定性分析<sup>(4,8)</sup>。

絞股藍應用範圍廣泛，除了開發作為保健用途之茶飲、膠囊等產品外，尚可應用為耐蔭地被植物<sup>(10)</sup>、植物性飼料添加劑<sup>(6)</sup>、滅螺藥劑<sup>(13)</sup>或是開發絞股藍葡萄酒<sup>(2)</sup>以及化妝品等多種用途。

<sup>1</sup>行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0671 號。

<sup>2</sup>行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員、國防訓儲研究助理、副研究員。

絞股藍組織培養已有許多研究報告，包括叢生芽大量繁殖系統之建立<sup>(23)</sup>、應用原生質體再生植株<sup>(26)</sup>或是絞股藍與鐵皮石斛原生質體融合之研究<sup>(25)</sup>。常(2005)建構絞股藍毛狀根培養系統生產絞股藍皂苷，以兩階段培養方式提高其總皂苷含量，添加茉莉酸甲酯刺激其皂苷含量，並開發生物反應器系統，認為可提供全年生產、不受氣候及地區影響的生產模式<sup>(5)</sup>。

本研究目的為針對台灣本土採集的絞股藍種源進行活性成份分析，並建立其癒傷組織培養與細胞培養系統，期能篩選具有高量活性成份植株為材料，建立其絞股藍皂苷之生產流程。

## 材料方法

### 一、種源蒐集及樣品處理

絞股藍種源係由國立自然科學博物館嚴新富博士提供，包括日本種1種及台灣地區採集材料。蒐集之種源以泥炭土為介質，盆栽方式栽培繁殖於本場溫室。選取生長良好之植株以熱風烘箱55°C乾燥後作為測定絞股藍皂苷之材料。

### 二、標準品及樣品製備

秤取人參皂苷標準品(GRg1, Sigma No. 12323, U.S.A) 5 mg，以甲醇準確稀釋濃度為400、200、100、50、25、12.5以及0 (對照組)  $\mu\text{g/ml}$ ，將200  $\mu\text{l}$ 分別裝入有蓋試管中，加入新配製的5%香草醛-冰醋酸200  $\mu\text{l}$ 與過氯酸800  $\mu\text{l}$ ，搖勻密塞後置於65°C水浴中15 min，取出後立即放置於冷水浴中冷卻至室溫，而後每試管加入冰醋酸5 ml搖勻，使用分光光度計(OPRON-3000, Korea)測定波長550 nm之吸收，並以甲醇作為空白吸光組，分別測定各濃度之吸光值。

剪取不同地區採集之絞股藍植株(GT4、GT5、GT8、GT9)以熱風完全乾燥後磨粉待用。各乾燥樣品與市售茶包(TB)皆秤取5 g，加入20倍重量比之二次水(100 ml)，70°C水浴加熱4hrs後以濾紙過濾並蒐集濾液，而後進行減壓濃縮至膏狀，使用75%乙醇50 ml完全回溶，再以濾紙過濾並蒐集濾液，水浴蒸發及減壓抽氣處理至無嗆鼻酒精味，而後使用分液漏斗裝盛石油醚50 ml混合搖晃多次後靜置，蒐取上層透明之醚層減壓濃縮至全乾，殘渣再用熱甲醇溶解定量至10 ml，取200  $\mu\text{l}$ 甲醇液裝於15 ml之有蓋試管中，加入新配製的5%香草醛-冰醋酸200  $\mu\text{l}$ 與過氯酸800  $\mu\text{l}$ ，搖勻密塞後置於65°C水浴中15 mins，取出後立即放置於冷水浴中冷卻至室溫，而後加入冰醋酸5 ml搖勻，使用分光光度計測定波長550 nm之吸光值。

### 三、癒傷組織誘導與繼代培養

剪取絞股藍葉片以2%次氯酸鈉滅菌15 mins後，於操作台中以無菌水清洗三次，切成1  $\text{cm}^2$ 大小，背軸面朝上培養於含有6-benzylaminopurine (BA; 0, 1, 3, 5 mg/l)及4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (picloram; 0, 0.2, 0.5, 1 mg/l)組合之MS (Murashige and Skoog, 1962)基礎培養基<sup>(20)</sup>，黑暗培養，培養溫度25 $\pm$ 1°C，一個月後調查其誘導癒傷組織產生之比率。

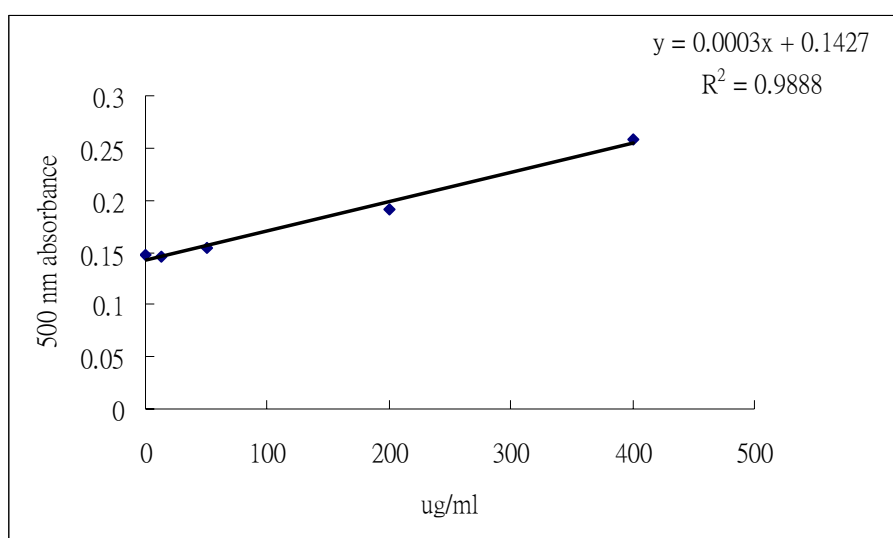
取鮮重約0.5 g癒傷組織繼代培養於含有5 mg/l BA及0.2 mg/l picloram之MS固體培養基，一個月後調查其鮮重增殖倍率。並選取生長良好之癒傷組織培養於總體積125 ml之側管

三角瓶，每瓶加入25 ml之液體培養基，配方同繼代培養基，但不加入洋菜。培養瓶固定於迴轉式振盪器(HIPOINT OS-54, Taiwan)，轉速維持在125 rpm，定時測量其細胞生長量。

## 結果與討論

絞股藍種源共計蒐集到1個日本種、13個台灣不同地區採集單株，培養於本場溫室，日本品種生長較差，其餘各本地種生長略有差異，絞股藍植株生長型態如圖二a所示。選定生長較旺盛的4個本地材料(代號分別為GT4、GT5、GT8、GT9)及市售茶包進行絞股藍皂苷測定。

人參皂苷標準品(GRg1)以甲醇回溶稀釋後測量波長550 nm吸光值，以濃度為橫座標，吸收度為縱座標，並使用Microsoft Excel軟體繪製檢量線並推導出趨勢線公式及其R-squared值， $Y = 0.0003X + 0.1427$ ， $R^2 = 0.9888$  (圖一)。將樣品測得之吸光值代入公式，即可求出絞股藍總皂苷之含量。



圖一、人參皂苷 GRg1 之標準檢量線。

Fig. 1. Standard calibration curve of Ginsenoside Rg1.

將各品系之吸光值代入標準曲線後，估算絞股藍總皂苷含量，並再計算其百分重量比，結果發現僅有品系TB (茶包)與GT4之550 nm之吸光值在標準曲線範圍內，其他測試樣品之吸光值則是低於空白吸光組而不予以討論，TB與GT4之絞股藍總皂苷含量分別約為165  $\mu\text{g}/5\text{ g}$  與1  $\mu\text{g}/5\text{ g}$ ，千分重量比為0.0033 %與0.00002 %，所以可推知GT4之絞股藍總皂苷含量相當微量。

植物活性成份之含量除了與植株本身特性有關之外，其生長期栽培方式、株齡、採收時期與前處理皆會影響其含量的表現。已建立標準品及各樣品萃取方法及分光光度計測定條件，萃取樣本之前處理則是將溫室栽培收穫枝葉後以熱風乾燥後進行後續萃取試驗，但測得

之含量極低，與市售茶包乾燥烘焙的條件亦有差異。前人研究顯示<sup>(1,4)</sup>，葉片中皂苷含量高，莖部含量低，採樣標準不統一會造成分析結果的差異；亦有研究指出皂苷含量主要是由各種絞股藍之遺傳特性所控制<sup>(19)</sup>。本研究之主要目的為開發本地採集植物作為生產絞股藍皂苷之原始材料，其中GT4品系雖測得之絞股藍皂苷含量甚低，但確定其具有目標活性成份，將可再針對其取樣部位、採樣時期及乾燥處理等部份進行深入研究。

測定不同生長調節劑組合對絞股藍葉片培養誘導癒傷組織之影響，不含picloram之培養基無法生成癒傷組織，含有0.2~1.0 mg/l picloram之培養基皆有癒傷組織生成，但0.2 mg/l picloram與低濃度BA (0~1 mg/l)組合之培養基同時有不定根(Adventitious root, AR)生成(表一及圖二b)。癒傷組織繼代於含有5 mg/l BA及0.2 mg/l picloram之基礎培養基，一個月後其鮮重增加2.57倍，無混生不定根，癒傷組織呈現黃白色、鬆軟之型態(圖二c)。絞股藍癒傷組織移入液體培養，初期生長迅速，第3天生長迅速，第4天新生細胞量達到最高，而後逐漸減少，培養至第7~10天後細胞量不再增加，細胞內容物充實，且細胞呈現團聚現象(圖二d, 圖三)，故選定每7天進行繼代培養，並以篩網過篩以維持其細胞大小。

表一、BA 及 Picloram 組合培養基對絞股藍葉片培植體誘導癒傷組織之影響

Table 1. Effects of BA and Picloram on callusing from leaves of *Gynostemma pentaphyllum*

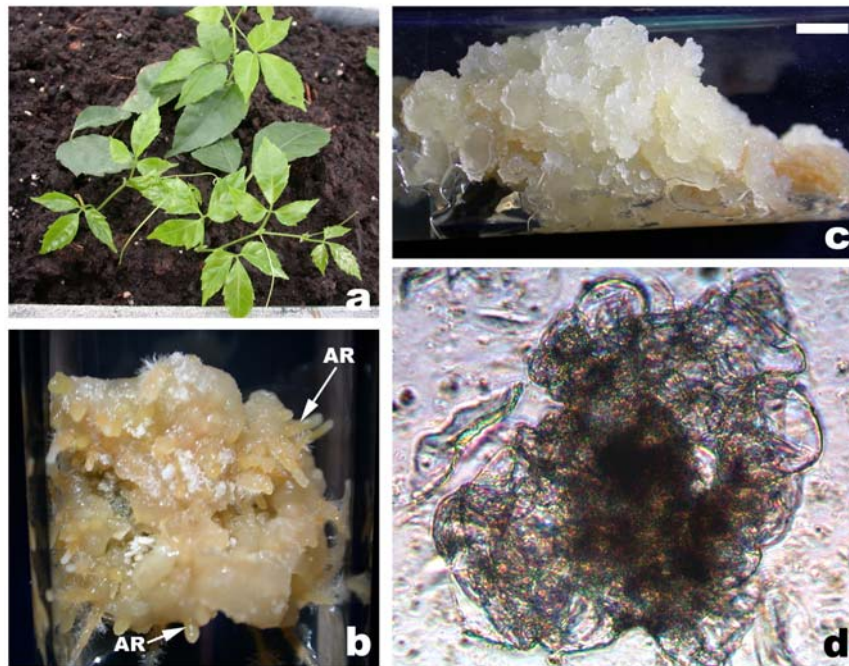
BA <sup>1</sup>	Picloram	癒傷組織生成率(%) <sup>2</sup>	不定根產生率(%) <sup>y</sup>
0.0	0.0	0.0	0.0
	0.2	100.0	87.5
	0.5	100.0	16.5
	1.0	54.2	0.0
1.0	0.0	0.0	0.0
	0.2	100.0	87.5
	0.5	100.0	0.0
	1.0	58.5	0.0
3.0	0.0	16.5	0.0
	0.2	100.0	16.5
	0.5	71.0	0.0
	1.0	100.0	0.0
5.0	0.0	16.5	0.0
	0.2	87.5	0.0
	0.5	83.5	0.0
	1.0	66.5	0.0

<sup>1</sup>基礎培養基為MS基本鹽類(Murashige and Skoog, 1962), 添加 100 mg/l myo-inositol, 0.5 mg/l nicotinic acid, 0.1 mg/l thiamine, 0.5 mg/l pyridoxine HCl, 2.0 mg/l glycine, 30 g/l 蔗糖, 2.5 g/l 水晶洋菜, pH 調整至 5.7。

<sup>2</sup>每處理 4 重覆, 共進行兩次實驗後取其平均值。

張等人(1995)報導應用幼莖切段後培養於含有1 mg/l 2,4-D及0.2 mg/l kinetin組合之MS固體培養基中誘導形成淡黃色、顆粒狀胚性癒傷組織並用以作為原生質體分離之材料，但未對其癒傷組織增殖倍率進行試驗<sup>(26)</sup>。徐等人(1991)將幼葉培植體培養於含有0.5~2.0 mg/l 2,4-D之MS培養基，20天後可觀察到癒傷組織形成<sup>(21)</sup>。癒傷組織培養在單獨添加1 mg/l 2,4-D之基礎培養基，轉速維持在120 rpm之條件下可建立絞股藍之液體培養系統<sup>(21)</sup>。劉等人(2007)以五柱絞股藍(*Gynostemma pentagynum* Z. P. Wang)新枝莖尖置於添加有1 mg/l BA及0.2 mg/l NAA之MS培養基中可誘導產生癒傷組織，培養12天後可見有癒傷組織增生<sup>(7)</sup>。本研究則嘗試以不同之生長調節劑—picloram誘導本地採集絞股藍之葉片產生癒傷組織，其與不同濃度BA組合皆可誘導產生癒傷組織，並已初步建立其液體培養條件。

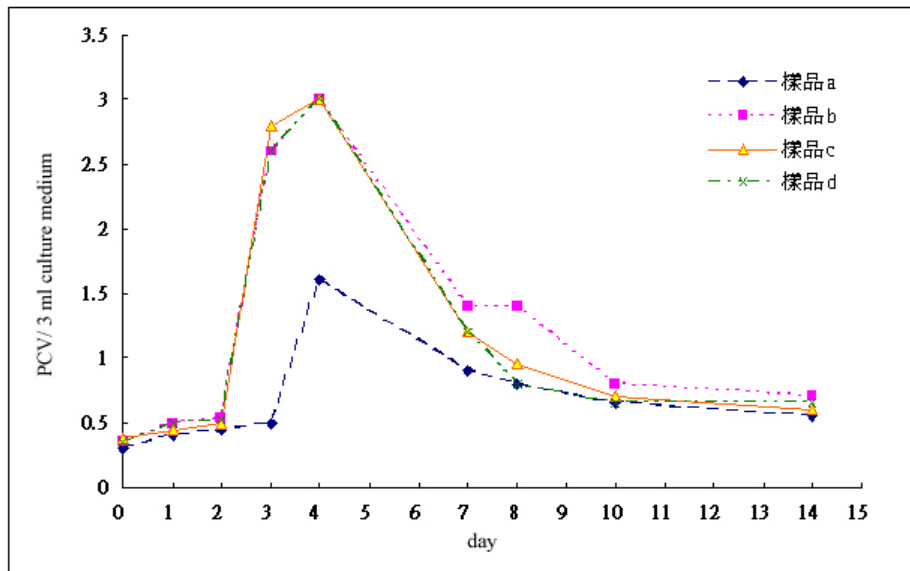
藥用植物二次代謝物之生產應用到植物組織培養系統，著眼於該系統提供較均一的培養環境，植物或細胞生長快速，且可提供大規模生產模式<sup>(27)</sup>。本研究已初步建立絞股藍癒傷組織誘導、繼代之條件，並觀察液體培養之細胞生長型態，將可提供其大量培養之基礎數據。



圖二、絞股藍葉片培養誘導癒傷組織及其液體培養細胞型態。

Fig. 2. The process of callus formation from leaf explants of *Gynostemma pentaphyllum*.

- 絞股藍溫室植株型態(bar = 5 cm)
- 葉片培養於低濃度 BA(0-1 mg/l)之培養基誘導得到之淡黃色團粒狀癒傷組織，並有多數不定根(AR)產生(bar = 5.5 mm)
- 繼代於含有 5 mg/l BA 及 0.2 mg/l picloram 組合之 MS 培養基之黃白色癒傷組織型態(bar = 3.7 mm)
- 液體培養後之細胞型態，細胞聚集，細胞質濃密(bar = 20 μm)



圖三、絞股藍液體培養過程細胞之生長曲線。

Fig. 3. Time course of the plant cell volume (PCV) in shake-flasks of *Gynostemma pentaphyllum*.

## 誌 謝

感謝國立自然科學博物館嚴新富博士協助採集及提供材料，並感謝台中區農業改良場張嫻君小姐及曹淑娟小姐協助實驗進行與樣品處理，俾使本研究能順利完成，特申謝忱。

## 參考文獻

1. 林如、曹玉芳、胡正海 2002 絞股藍營養器官的結構及其人參皂苷的組織化學定位研究 西北植物學報 22(4): 796-800。
2. 林維年 1993 絞股藍葡萄酒研究報告 食品工業科技 6: 5-9。
3. 范杏旻 2003 七葉膽成份分離技術之研究 碩士論文 高雄 國立高雄師範大學化學系。
4. 徐翠鳳、羅嘉梁、王碧蘭 1994 絞股藍化學成份分析 林產化工通訊 2: 3-6。
5. 常振鎧 2005 建構絞股藍毛狀根培養系統生產類人參皂苷之研究 博士論文 臺北 國立臺灣大學微生物與生化學研究所。
6. 彭小列、劉世彪 2005 絞股藍是一種有開發前景的植物性飼料添加劑 資源開發利用 5: 26-27。
7. 劉世彪、陶民、姜叢芳、黃衡宇 2007 五柱絞股藍的組織培養和快速繁殖 植物生理學通訊 43(2): 308。
8. 盧金清、肖波、陳黎、喻樊、田耀平、詹曉蓮、徐玉婷、萬威 2007 分光光度法測定絞股藍中總皂苷的含量 湖北中醫雜誌 29(1): 50-52。

9. 蕭培根、連文炎 1998 原色中藥原植物圖鑑 p.466 臺北 南天。
10. 蕭遠峰、高話 1996 耐蔭保健地被植物-絞股藍的研究 四川草原 2: 10-13。
11. Chen, S. K. 1995. A classificatory system and geographical distribution of the genus *Gynostemma* BL. (Cucurbitaceae). *Acta Phytotaxonomica Sinica* 33(4): 403-410.
12. Hou, H. L. and T. S. Fu. 2006. Research advance in the chemical ingredients and pharmacological effects of *Gynostemma pentaphyllum*. *Progress in Veterinary Medicine* 27:59-61.
13. Hou, J. H., W. X. Wang, Y. Yang, H. Ni, Y. Zhang, J. L. Zhang, L. H. Shu and Z. D. Cheng. 2006. Molluscicidal activity of soaking liquids of *Gynostemma pentaphyllum* on *Oncomelania hupensis*. *Journal of Hubei University* 28(3): 306-308.
14. Huang, P., J. L. Cheng, L. Zhang and B. Lin. 2007. Effect of gypenoside on blood lipid and micralbuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *China Journal of Modern Medicine* 17(2): 206-208.
15. Huang, W. C., J. J. Shen, C. J. Liou, M. L. Kuo, Y. P. Chang, R. C. Yang and M. L. Li. 2007. Enhancing TH1 Cell Activities in Mice by Short-term Oral Administration of *Gynostemma pentaphyllum* Extracts, *BioFormosa* 42(1): 9-16.
16. Kazuko, Y., A. Masahiro, K. Kuki, T. Tsunematsu and A. Shigenobu. 1987. On the Sponin Constituents of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Shoyakugaku Zasshi*. 107(5): 361-366.
17. Li, W. L., H. C. Zheng, J. Bukuru and N. De Kimpe. 2004. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology* 92: 1-21.
18. Liu, H. Y. 2000. *Gynostemma* Blume p.860. In: Huang, T. C. (eds.) *Flora of Taiwan Second Edition Volume III*, Editorial committee of the flora of Taiwan, Department of Botany, National Taiwan University, Taipei.
19. Liu, S. B., R. Lin and Z. H. Hu. 2006. Comparison of stem and leaf structures and total gypenosides among 5 species of *Gynostemma*. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University* 35(5): 495-499.
20. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15: 473-479.
21. Sakamaki, H., K. I. Itoh, T. Taniai, S. Kitanaka, Y. Takagi, W. Chai and C. A. Horiuchi. 2005. Biotransformation of valencene by cultured cells of *Gynostemma pentaphyllum*. *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 32: 103-106.
22. Shi, H. Z. and J. C. Cheng. 1991. Cell culture of *Gynostemma pentaphyllum* and its physiological and biochemical characteristics. *Plant Physiology Communications* 2: 97-100.

23. Shi, X. G., L. Zhou, X. F. Wang, X. W. Zhang, Y. H. Cheng, P. Qiu and X. C. Zhang. 2006. Fast propagation of *Gynostemma pentaphyllum* (thunb.) Makino. Journal of Southwest Agricultural University 28(2): 319-321.
24. Wang, Q. F., J. C. Chen and L. C. Tseng. 2003. A review of *Gynostemma pentaphyllum* on pharmacology and clinic application. J. Int. Chin. West Med. 4(1):17-26.
25. Wei, X. Y. and M. Zhang. 2004. Protoplast fusion in *Dendrobium candidum* and *Gynostemma pentaphyllum*. Chinese Traditional and Herbal Drugs 35(7): 811-814.
26. Zhang, H. N., Q. S. Wu and D. J. Liu. 1995. Protoplast culture and plant regeneration from the suspension cells of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Mak. Chinese Journal of Biotechnology 11(3): 285-287.
27. Zhou, L. G. and J. Y. Wu. 2006. Development and application of medicinal plant tissue culture for production of drugs and herbal medicinals in China. Natural Product Reports 23: 789-810.



# Production of Gypenosides by Cell Culture System of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino.<sup>1</sup>

Ying-Chun Chen<sup>2</sup>, Xhao-Kai Kuo<sup>2</sup> and Long-Zen Chang<sup>2</sup>

## ABSTRACT

*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino belongs to the Cucurbitaceae and its gypenosides closely resemble in ginsenoside. We established the GRg1 detection system and also found the similar component in a plant material native in Taiwan. Calli were induced from leaf explants on Murashige and Skoog (MS) basal medium plus 0.2-1.0 mg/l picloram. The first of these was pale yellow in color, compact in texture and watery in appearance. These calli could be maintained by subculturing every month with basal medium supplemented with 5 mg/l BA and 0.2 mg/l picloram. Liquid culture system was established by subculturing cells every 7-10 days.

**Key words:** *Gynostemma pentaphyllum*, gypenoside, callus, cell culture.

---

<sup>1</sup>Contribution No. 0671 from Taichung DARES, COA.

<sup>2</sup>Assistant Researcher, Research Assistant and Associate Agronomist of Taichung DARES, COA.