



RRPG88BO0026 (15.P)

計畫編號：CCMP88-RD-055

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

藉由組織培養技術復育繁殖雷公藤

委託研究報告

計畫委託機關：私立嘉南藥理學院

計畫主持人：王姿文

研究人員：廖恆祁 鄭光男

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

計畫編號：CCMP88-RD-055

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：PG88BO-0026

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

藉由組織培養技術復育繁殖雷公藤

委託研究報告

計畫委託機關私立嘉南藥理學院

計畫主持人：王姿文

研究人員：廖恆祁 鄭光男

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

行政院衛生署中醫藥委員會八十八年度
委託研究計畫成果報告

藉由組織培養技術復育繁殖雷公藤

執行機構：嘉南藥理學院

計畫主持人：王姿文

研究人員：廖恆祁、鄭光男

執行期限：87年7月1日至88年6月30日

中文摘要	2
英文摘要	3
壹、前言	4
貳、材料與方法	6
參、結果	7
肆、討論	7
伍、結論與建議	8
陸、參考文獻	8
柒、圖、表	11

藉由組織培養技術復育繁殖雷公藤

計畫主持人：王姿文

執行單位：嘉南藥理學院

摘要

雷公藤是一用來治療風濕性關節炎、自體免疫疾病（如紅斑性狼瘡）的藥用植物。含有雷公藤素（trypterygine）、wilforidine、wilfodeine 及 wilforgine 等生物鹼，具有抗發炎的作用，在大陸地區已研發成藥劑，國內則仍在開發階段。但由於國內環境之變化，造成雷公藤已瀕臨絕種。有鑑於此，本計畫乃針對雷公藤以組織培養技術來進行繁殖復育，使研究材料不虞匱乏，除了避免絕種外，亦可使藥用品質穩定，經由癒合組織（callus）的萃取，更可使雷公藤素等生物鹼量提高。

由於組織培養技術的建立需要不斷的嘗試以得到最佳生長條件，故擬以二年來進行完整之實驗。本計畫即為第一年所進行之計畫，主要為建立雷公藤組織培養之相關技術。計畫進行至今，已找出數種能夠順利長出癒合組織及大量生長的培養基，接續的癒合組織的藥性分析與復育繁殖則於第二年進行，目前正持續進行中。本計畫之進行與成功將可提供藥用植物臨床上的新選擇，不但使中國傳統醫藥在治療上有較新的發展，而且可避免因環境的變遷或限制而無法取得藥材。

關鍵詞：雷公藤、組織培養

To reproduce *Tripterygium wilfordii* Hook. f. by the technique of plant tissue culture

Tze-Wen Wang

Chia Nan College of Pharmacy and Science

ABSTRACT

Tripterygium wilfordii Hook. f. is a poisonous medicinal plant, has been clinically used for the treatment of rheumatoid arthritis and autoimmune diseases. It contains alkaloids (tripterygine, wilfordine, wilfodéine, and wilforgine), multiglycosides, triterpenoids, and nontriterpenoids, possessing marked anti-inflammatory, analgesic and immunosuppressive actions, and has been well developed as pharmaceutical preparations for clinical use in China mainland. However, this plant is becoming extinct in Taiwan due to environmental changes. The aim of the present study protocol attempts to breed this plant by the tissue culture technique and thus to prevent it from extinction. In addition, the main constituents in callus will be extracted and analyzed chromatographically. The tissue culture technique need attempt continually for optimal growth condition. Two years of researching period will be needed for the establishment of optimized conditions for the culture and the analytically method. This content is the first year research, has been establish the tissue culture technique for *Tripterygium wilfordii* Hook. f. . We have some optimal mediums for inducing callus. Proceeding work is the analysis of chemical contents for callus. The successful accomplishment of this study will provide an alternative choice for the medicinal plant, not only be able to promote the newer development on the traditional Chinese medicine, but also to prevent from limitation of maternal resources due to environmental changes.

Keywords : *Tripterygium wilfordii* Hook. f. , tissue culture

壹、前言

藥用植物在中國民間已有數千年的使用歷史，近十幾二十年一些中醫藥學家的努力，及英、法等國逐漸對藥用植物的藥用成效有相來由於當的肯定，才使得中醫藥在國內的研發於西藥領軍的環境中漸被重視。

本研究所用之材料，雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)，屬衛矛科，其藥用及成分分析已有諸多研究及成果，可作為殺蟲劑，其莖部含雷公藤素 (trypterygine) 及 wilforidine 兩種生物鹼，而根部含 wilfodeine 及 wilforgine (1、2)。目前在臨床上可用來治療紅斑性狼瘡 (lupus nephritis) (3)、類風濕性關節炎 (4、5、6) 以及男性避孕藥之開發 (7、8)。由於具有抗發炎作用，應用在狼瘡性腎炎可避免以免疫抑制劑或大量類固醇來治療所引發的臨床副作用。在動物及人體外實驗均已證實可抑制老鼠胸腺細胞的增生；抑制中性球吞噬能力；明顯抑制第一、二、六、八介質 (interleukin I、II、VI、VIII) (3、7) 及免疫球蛋白產生；而且可抑制前列腺素之製造。在治療類風濕性關節炎上亦可有效抑制類風濕性關節炎患者滑液膜中之第一介質及細胞間黏附分子的分泌，在較高的濃度下亦可抑制軟骨和滑膜細胞的第一介質生成等，均與免疫機制有關。另外的新發現為雷公藤可抑制男性精蟲的活動力，因此可開發作為口服男性避孕藥。國內對於雷公藤的藥劑開發仍在進行中，然在中國大陸已有顆粒製劑生產 (9)，因此得加快研發速度，但由於國內生態環境之變遷，使得台灣本土的雷公藤野生數量人為減少，在研究及應用上不僅難以取得材料，而且有瀕臨絕種之踰，有鑑於此，因而想藉植物組織培養之技術，一方面進行雷公藤之復育繁殖，另一方面進行本土型雷公藤之藥性分析，以作為國內雷公藤製劑開發之用。

組織培養的理念始於 1902 年 Haberlandt (10)，嘗試進行從細胞誘

長出植物，雖未獲成功，但對未來之研究已有很大的激勵作用。至 1930 年代，普林斯頓大學 White (11) 等人進行蕃茄根尖培養，已可順利於液體培養基中生長，且經繼代培養 (subculture) 後亦生長良好。White 所配製的培養基為進行組織培養之重要因素，其中所添加之 yeast extract、glycine、vitamins 及 pyrodoxin 等物質為細胞生長重要因子 (12、13)。至 1965 年，Vasil 與 Hildebrandt 將單離的煙草細胞，藉適當的培養條件，可使其發育為完整植株 (14)。細胞的這種全能性 (totipotency) 已顯示單一個體細胞因其含有完整的染色體 (基因)，可於發育過程中增加細胞數量外，亦具有分化的能力。國內組織培養技術之研究與應用多年來已有相當成績，尤其在經濟花卉上，蝴蝶蘭、百合花、白鶴芋、火鶴花等均已有量產，供給內外銷，不但確保花卉品質而且數量大幅增加。因此在雷公藤的組織培養上可藉其經驗，找出培養雷公藤之最佳條件，以達到繁殖復育及優良品種保存之目的，並可加強雷公藤中藥藥劑之開發。本計畫擬以二年來進行完整之研究，逐年之目的為：

1. 雷公藤組織培養技術之建立與復育：

(a) 以組織培養技術誘發雷公藤產生癒合組織，找出癒合組織的最佳生長條件。(第一年)

(b) 加入適當的發根劑，使植株先於培養瓶中生長，再逐漸馴化，移植至室外培養。(第一、二年)

2. 雷公藤癒合組織之分析：

(a) 大量繁殖後的雷公藤癒合組織以 GC 或 HPLC 作成分分析。(第二年)

(b) 與植株及顆粒製劑做成分之比較。(第二年)

此計畫之達成可作為藥用植物以組織培養技術研發藥劑之典範，除了解決雷公藤材料缺乏的困擾外，亦提供其他藥用植物開發之參考。

貳、材料與方法

雷公藤植株由南投杉林溪森林遊樂區所提供，於栽植二星期後摘取適當部位予以誘發。組織培養技術在許多植物已研究進行多年，然在雷公藤則尚未有所報導，故於進行組織培養時乃先採用其他植物有良好效果的培養技術與方法，再以此為基礎進行改良，找出最適合雷公藤組織培養的最佳條件，建立雷公藤組織培養之技術（15、16、17、18、19、20、21、22、23）。

（一）、組織培養

1. 首先採集生長良好之雷公藤植株，種植於正常土壤中，一段時間後將取適當的莖、葉部分切下，作為誘發癒合組織之材料。
2. 以 0.5% NaClO 及 2 滴 100ml 之 Tween20 殺菌 20 分鐘後，以無菌水清洗二次。
3. 選用接近生長點之植株部位，切成約 $4 \times 5 \times 1$ mm 的大小，置於不同培養基中培養。
4. 觀察組織培養之狀況，記錄生長速率、癒合組織 (callus) 的分裂情形、多久需置換新培養基等。
5. 分析那一種培養基最適合雷公藤癒合組織的生長。

（二）、復育繁殖

1. 將生長良好的雷公藤癒合組織置換至一含有發根劑的培養基中，於不同溫度、光線下培養一段時間後，觀察其發根與長莖、葉的情形，取最佳的發育分化條件，大量繁殖。
2. 當瓶苗生長至 5-10 cm 時，將其移至室外予以馴化，約 1-2 星期後，再將瓶苗由培養瓶移至一般培養土中培養。

參、結果

1. 不同培養基對誘發癒合組織之結果

本實驗首先配置四種不同培養基 A、B、C、D (見表一)，將消毒處理過的葉片與嫩莖切塊分別置於培養基中培養，其誘發結果整理於表二及表三。

2. 植株不同部位的誘導結果

所採取的植株不同部位雖然均具有分裂旺盛之細胞，但各部位的狀況都有不同的差異性，其中已嫩葉、莖頂端生長點所誘發的癒合組織 (callus) 成功率較高，其結果如表二及表三。

3. 癒合組織誘發成植株的初步結果

由各培養基所誘發出的癒合組織，待其長成約 $0.5-1.0\text{ cm}^3$ 時，取部分置於具有低 auxin (包括 IAA、2,4-D、NAA 等) 及高 cytokinin (包括 6BA、KIN 等) 的培養基中，觀察其分化成莖的結果；另外部分癒合組織則置於只具 auxin 或低濃度 cytokinin 的培養基中，觀察其分化成根的結果。目前有部分具有分化之現象，正觀察記錄中。(此為第二年計畫之部分)。

肆、討論

1. 在不同培養基對誘發成癒合組織之結果中(表二及表三)，顯示此四種培養基分別有至少 12.5%、25%、20%、20% 的成功率，其中以 A 與 D 培養基的誘發效果稍高。而在植株不同部位的誘發結果上，則明顯顯示捲曲莖具有最高的被誘發率，可達 86.6%。比起嫩葉的 71.4% 高，此結果表示捲曲莖的細胞最原始、分化過程最不完整，許多植株細胞分化完成時被抑制的基因仍在表現中，故較易為人工操作所改變其本來的成長分化過程。

故將來的植株誘發過程中可以捲曲莖作為誘發之植株部位。

2. 雷公藤癒合組織誘發成植株的初步結果顯示可以無性繁殖，即組織培養的方式來大量繁殖雷公藤，可保留原植株的特性，但因癒合組織在不斷的切割與換新鮮培養基的過程中，可能有突變的現象，故需定時予以觀察記錄，以確保分生植株的一致性。

伍、結論與建議

藥用植物的開發在中藥界中具有相當重要的地位，許多植物均具有特殊的療效，但其實際應用則因對植物之藥性不瞭解，或因植物取得之困難而無法有效的運用在臨床研究及治療上，因此加強藥用植物資源開發為現今重要的課題之一。此計畫即以此為主要目的。雷公藤具有抗發炎的作用，可用來治療治療紅斑性狼瘡、類風濕性關節炎等疾病，但因材料取得不易，故擬以組織培養來復育繁殖，並分析過程中癒合組織的藥物成分，視是否能以癒合組織取代植株做為藥物之來源。本計畫之第一年已完成組織培養技術之建立，數種可誘發癒合組織的培養基，與誘發過程中以捲曲莖為最佳材料，成功率可達 86.6%。接續之研究則開始分析癒合組織之藥物成分與分生植株的大量繁殖。

陸、參考文獻

1. 邱年永、張光雄. 1992. 原色台灣藥用植物圖鑑. 台北南天書局發行.
2. Chou W. C., Wu C. C., Yang P. C., and Lee Y. T. 1995. Hypovolemic shock and mortality after ingestion of *Tripterygium wilfordii* hook F. :a case report. Int. J. Cardiol., Apr., 49(2):173-177.
3. Chang D. M., Chang W. Y., Kuo S. Y. and Chang M. L. 1997. The effects of traditional antirheumatic herbal medicines on immune response

- cells. J. Rheumatol. Mar., 24(3):436-441.
4. Ushiro S., Ono M., Nakayama J., Fujiwara T., Komatsu Y., Sugimachi K. and Kuwano M., 1997. New nortriterpenoid isolated from antirheumatoid arthritic plant, *Tripterygium wilfordii*, modulates tumor growth and neovascularization. Int. J. Cancer, Aug., 7, 72(4): 657-663.
 5. Lipsky P. E. and Tao X.L. 1997. A potential new treatment for rheumatoid arthritis: thunder god vine. Semin Arthritis Rheum., Apr., 26(5): 713-723.
 6. Gu W.Z., Chen R., Brandwein S., McAlpine J. and Burres N., 1995. Isolation, purification, and characterization of immunosuppressive compounds from tripterygium: triptolide and triptodioid. Int. J. Immunopharmacol. May, 17(5): 351-356.
 7. Tao X., Davis LS., Hashimoto K. and Lipsky PE., 1996. The Chinese herbal remedy, T2, inhibits mitogen induced cytokine gene transcription by T cells, but not initial signal transduction. J. Pharmacol Exp. Ther., Jan., 276(1): 316-325.
 8. Tao X., Cai JJ. and Lipsky PE., 1995. The identity of immunosuppressive compounds of the ethyl acetate extract and chloroform methanol extract (T2) of *Tripterygium wilfordii* hook F. J. Pharmacol Exp. Ther., Mar., 272(3): 1305-1312.
 9. Zheng J.F. and Chen S.Y. 1995. Observations on therapeutic effects of huangdan decoction and *Tripterygium wilfordii* tablet on membranous glomerulonephritis in rats. J. Tongji. Med. Univ., 15(1): 31-34.
 10. Haberlandt G. 1902. Kulturversuche mit isolierten

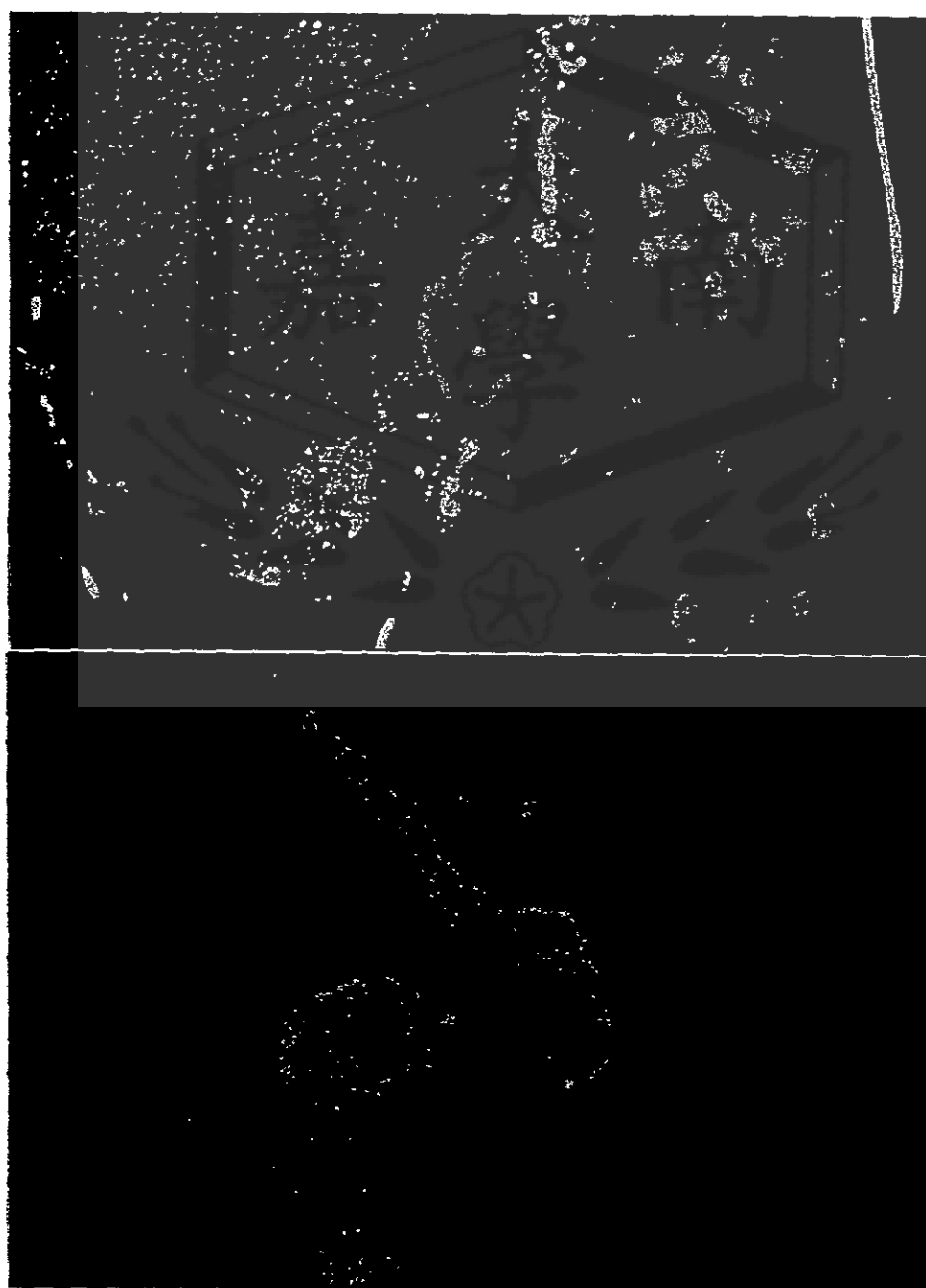
Pflanzenzellen. Sitzabber. Akad. Wiss. Wien. Math. Naturwiss.
Kl. Abt. 1 111:69-92.

11. White P.R. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.* (Bethesda) 9:585-600.
12. White P.R. 1937. Vitamin B1 in the nutrition of excised tomato roots. *Plant Physiol.* (Bethesda) 12:803-811.
13. White P.R. 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Am. J. Bot.* 26:59-64.
14. Vasil V. and Hildebrandt A. C. 1965. Differentiation of tobacco plants from signal isolated cells in microcultures. *Science.* 150: 889-890.
15. Davies, D. R. 1980. Rapid propagation of roses in vitro. *Sci. Hortic.* 13 : 385-389.
16. Hussey, G. 1982. *In vitro* propagation of *Narcissus*. *Ann. Bot.*, 49 : 707-719.
17. Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15 : 473-497.
18. Chen W. H., Hsieh R. M., Tsai W. T., Fu Y. M., Chyou M. S., Wu C. C. and Lin Y. S. 1995. Phalaenopsis at the TSC: report on advance research in breeding at the Taiwan Sugar Corporation. *Amer. Orchid. Soc. Bull.*, 64:492-495.
19. 周昌德、馬溯軒、許圳塗. 1992 植物組織培養發展概況 園藝作物組織培養實用技術 豐年社 HV #921 : 11-14.
20. 劉明哲. 1988. 藥用植物栽培技術. 五洲出版社.
21. 馬溯軒、許圳塗. 1988. 植物再生與繁殖及改良. 園藝作物組織培養.

之應用研討會專集.

22. Brooks R.M., Bradley M.V. and Anderson T.I. 1966. Plant microtechnique manual. 金銘圖書有限公司(台灣版).
23. Thorpe T.A. 1981. Plant tissue culture- methods and application in agriculture. Academic press.

柒、圖、表



圖一 雷公藤所誘發之癒合組織

表一

	A	B	C	D
MS 大量元素	1/10 X	1/10 X	1/100 X	1/30 X
MS 小量元素	1/100 X	1/100 X	1/100 X	1/100 X
Vitamin kit	1/1000 X	1/1000 X		1/1000 X
Sucrose	20 g	20 g		20 g
BA	1 ml	5 ml	1 ml	0.1 ml
2-4-D	1.25 ml	0.5 ml	0.5 ml	
NAA				2 ml
活性炭				2 g
椰子水	150 ml			
Agar	8-10 g	8-10 g	8-10 g	8-10 g
PH 值	5.8	5.8	5.8	5.8

BA : 1000 ppm

NAA : 500 ppm

2-4-D : 200 ppm

Vitamin kit : see Sigma catalog 1998, p. 2156.

表二

	A	B
一般葉片	8/26 [*]	6/24
嫩葉	10/20	8/18
一般莖部	1/8	2/8
嫩莖	4/9	4/8
捲曲莖	13/15	9/12

※：誘發成 callus 的數目/培植體數目

表三

	A	B	C	D
一般葉片	9/22 [*]	6/18	4/20	5/25
嫩葉	15/21	10/25	11/21	12/18
一般莖部	4/10	4/10	2/10	3/9
嫩莖	6/10	8/11	5/8	6/9
捲曲莖	12/15	11/14	9/12	11/14

※：誘發成 callus 的數目/培植體數目