

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥毛狀根的誘導及毛狀根萃取物之腫瘤抑制能力的初步研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CN9738

執行期間：97年1月1日至97年12月31日

計畫主持人：常振鎧

共同主持人：

計畫參與人員：常振鎧

執行單位：食品科技系

中華民國98年2月28日

摘要

建立生長迅速的毛狀根培養系統是研究植物二次代謝產物的先決條件。本研究利用農桿菌根群菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 分別對中草藥絞股藍 (*Gynostemma pentaphyllum*) 及掌葉大黃 (*Rheum palmatum* L.) 之外植體進行感染，以誘導毛狀根產生。再經由 PCR 方法，確認建立了絞股藍及掌葉大黃毛狀根的培養系統。並針對絞股藍毛狀根萃取液的生理活性進行了初步探討。為進一步篩選適宜的絞股藍毛狀根培養系統及二次代謝產物的生產研究奠定了基礎。

前言

「肝癌」連續多年名列國人癌症死因之首，對國人健康的威脅不可忽視。在慢性病毒肝炎、肝硬化、肝癌等疾病治療上，西方醫學尚缺乏有效之藥物，因此，利用中草藥發展出具有保肝、抑制肝癌等藥物，是極具開發潛力之領域。

絞股藍 (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) 為葫蘆科 (Cucurbitaceae) 絞股藍屬多年生宿根性蔓生草本，又名七葉膽，日本則稱之為甘茶蔓 (amachazuru)。日本學者Takemoto等自1970年代就開始對絞股藍所含的化學成分進行研究，發現其所含皂甙成分的基本結構為四環三萜達瑪烷型 (dammarane-type) 衍生物 (Takemoto *et al.* 1983)。目前已知有將近90種絞股藍皂甙之結構已經被鑒定出來，其中絞股藍皂甙III、IV、VIII、XII分別與人參皂甙Rb1、Rb3、Rd及F2結構完全相同，部分絞股藍皂甙水解後產物亦與人參皂甙Compound K(C-K)等成分結構一致，因此引起廣泛注意。近年來，經國內外學者研究證明，絞股藍含有豐富的人參皂甙及多種人體必需的氨基酸和微量元素，具有抗疲勞、抗衰老、滋補強壯、促進細胞新陳代謝、抗腫瘤細胞增殖、增強免疫、抗胃潰瘍、抗心肌缺血、降血脂等多種藥理功能(楊榮季1999;姜彬慧等2003; Norberg *et al.* 2004)。大黃為蓼科多年生草本植物掌葉大黃 (*Rheum palmatum* L.)、唐古特大黃 (*R. tanguticum* Maxim.ex Balf)、藥用大黃 (*R. officinale* Baill.) 的乾燥根及根莖。性寒、味苦。歸脾、胃、大腸、肝、心經。現代藥理及臨床研究證明，大黃具有瀉下、通瘀導滯、抗菌消炎、止痛止血、清除自由基、抗腫瘤及抗突變等作用(劉興祥1992)。

毛狀根是以農桿根群菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 感染植物外植體後獲得的人工培養根器官，具有生長迅速、遺傳性狀穩定並能合成與原植物相同或類似水準之活性化合物等特點。因此，毛狀根培養在生產植物二次代謝物和傳統中草藥有效成分方面具有很大的發展潛力。雖然中草藥毛狀根可利用液態深層培養方式進行生產，且具有避免破壞自然資源、降低成本及大量生產之優點(Chang *et al.*, 2005)。但中草藥毛狀根之深層發酵培養物是否具有開發的價值，其前提是必須確定人工發酵培養所得之毛狀根和天然的中草藥之間是否具有相似之生理功能？然而遺憾的是，迄今為止所發表之文獻，較少有毛狀根深層發酵培養物生理活性之探討，因此難以正確評估毛狀根培養物與野外栽培中草藥在生理活性上之差異，致使中草藥毛狀根深層發酵培養未來之發展面臨相當大的困難。

有鑑於此，我們規劃了以下實驗，首先分別建立穩定的絞股藍及大黃毛狀根

之培養系統，以期未來可應用在大量生產藥用有效成分。接著，利用MTT檢測法評估絞股藍毛狀根萃取液對人類肝癌細胞Hep3B體外增殖抑制的效果。我們深信，此項研究結果將提供日後應用絞股藍毛狀根擴大培養生產二次代謝產物之重要參考，未來並可應用於保健食品或新藥開發。

材料與方法

1. 培養基之配製

依據植物組培培養基及 YEB 培養基之組成，分別配製 B5 (Gamborg & Miller 1968)、MS (Murashige & Skoog 1962) 及 YEB 等培養基，121°C 滅菌 20 分鐘，冷卻後備用。

2. 細菌菌株之保存及活化

農桿根群菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 保存於 YEB 平板培養基。感染前挑取單一菌落接種於 YEB 液態培養基，於 28 °C、100 rpm 震盪培養 24 小時，離心，菌體以不含蔗糖之 MS 培養基重新懸浮，調整菌體濃度為 OD₆₀₀=0.8~1.0，加入 acetosyringone 使最終濃度達 20 μM，25 °C 暗處靜置 4 小時使菌體活化。

3. 無菌外植體之取得

分別取絞股藍、掌葉大黃帶芽莖，切段。經酒精及次氯酸鈉水溶液消毒後，用無菌水沖洗乾淨，無菌濾紙吸乾水分，置於無激素的 MS 固體培養基。2 星期後從芽尖處長出新的幼嫩的無菌小植株。分別將小植株的葉柄、莖切成 1.5 cm 長的小段，葉片在垂直於葉脈處刻痕，造成傷口，移入適當之植物組培培養基，25 °C 暗處培養。

4. 毛狀根之誘導

分別將絞股藍、掌葉大黃無菌外植體移入含 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 之 MS 培養基，25 °C 暗處預培養 48 小時。預培養後之植物無菌外植體浸漬於活化後之農桿根群菌菌液，室溫下放置 30 分鐘。無菌濾紙吸乾多餘菌液。置回原培養基，於 22 °C 暗處共培養 48 小時。然後移入含抗生素 carbenicillin (300 μg L⁻¹) 之 MS 培養基進行除菌培養。

對照組以不含農桿根群菌之 MS 培養基進行感染。

5. 大黃毛狀根之單離培養

待毛狀根長出，切下根尖 (約 2.0~3.0 cm) 單離培養，持續除菌至無菌為止。篩選生長旺盛，分支多且細長的毛狀根進行單株化，毛狀根單株以 MS 培養基每 4 週繼代培養一次。

6. 毛狀根系之確認

6.1 農桿根群菌 Ri 質體之抽取

菌液離心後，沉澱以無菌水清洗，再以 1 mL 無菌水重新懸浮。置於 95 °C 乾浴器 10 分鐘，急速置於冰上冷卻 20 分鐘。離心後，上清液即可用於 PCR。

6.2 植物基因組 DNA 之抽取

中草藥野生植株與毛狀根基因組 DNA 之抽取參照 Thomson & Henry (1995)

之方法。取 100 mg 新鮮材料，加入 400 μ L 預熱至 65 $^{\circ}$ C 之 TPS(template preparation solution)，65 $^{\circ}$ C 水浴 1 小時。離心，加入 1 倍體積的 CI(chloroform:isoamyl alcohol, 24:1, v/v)，溫和混勻。離心，上清液加入 1/10 體積 7.5 M NH_4OAc 和 2 倍體積無水酒精。置於 -20 $^{\circ}$ C 1 小時。離心 10 分鐘。沈澱用 70 % 的酒精清洗兩次。置無菌操作檯中吹乾，加入 100 μ L 無菌水或 TE buffer 復溶。

6.3 PCR 分析條件

6.3.1 PCR primer

Gene	Primer 1	Primer 2
<i>rolB</i>	5'-GATGGGCTCTTGCAGT-3'	5'-GGCTCCGGTGAGGAG-3'
<i>rolC</i>	5'-TGTGACAAGCAGCGATGAGC-3'	5'-AAACTTGCACTCGCCATGCC-3'
<i>virC</i>	5'-ATCATTTGTAGCGACT-3'	5'-AGCTCAAACCTGCTTC-3'

6.3.2 PCR 反應液之配製

Reagents	Volume (μ L)	Final concentration
Template	2	
Primer 1 (25 μ M)	2	1 μ M
Primer 2 (25 μ M)	2	1 μ M
10 x Taq buffer	5	
Q- H_2O	37.3	
dNTP (10 mM/each)	1	200 μ M each
Taq DNA polymerase (2 u μ L $^{-1}$)	0.7	1.4 u
Mineral oil	40	
Total	50	

6.3.3 PCR 之條件

Program	Cycle number
94 $^{\circ}$ C, 3 min	1
94 $^{\circ}$ C, 1 min; 55 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min	35
72 $^{\circ}$ C, 5 min	1

6.3.4 DNA 電泳

取 5~10 μ L PCR 產物與 1/10 體積的 loading dye 混合，以 1.5% agarose，100 伏特電壓進行電泳。

7. 毛狀根之培養

將毛狀根接種於 MS 液體培養基，於 25 $^{\circ}$ C 暗處、80 rpm 進行繼代培養。以液體振盪培養 25 天的毛狀根作為接種材料，取長度一致（約 3.0 cm）、粗細均

勻的毛狀根根尖，分別培養在裝有 30 mL 不含激素之 MS 培養基的 125 mL 三角瓶中，接種量為每瓶 9 根，於 25 °C 暗處、80 rpm 震盪培養 49 天。培養結束後，收集毛狀根，二次水洗去附著之培養液。45°C 烘乾後磨粉備用。

8. 絞股藍毛狀根萃取液之製備

取乾燥之絞股藍毛狀根，粉碎成細粉，加入蒸餾水，煎煮抽取 1 小時左右，過濾，收集濾液。重複抽取一次，合併濾液。將濾液隔水蒸煮。以二次水定容至每 1 mL 濾液中含有生藥 1 g 作為 stock solution，0.22 μm 濾膜過濾後，-20°C 保存備用。實驗時以細胞培養液按比例稀釋。

9. 細胞增殖抑制作用分析 (MTT assay)

調整細胞濃度為 1×10^5 /mL，接種於 96-well 細胞培養皿，每 well 接種 100 μL，待細胞完全貼附後，傾去細胞培養液，分別加入含有受試樣品之細胞培養液，包括無藥對照組 (H₂O) 以及 5~6 個不同濃度的待測樣品，每個濃度至少 8 well。作用 72 小時後小心吸掉含藥培養液，以 MTT 法定量檢測細胞的活性，計算細胞生長抑制率 = $[(\text{對照組 OD 值} - \text{實驗組 OD 值}) / \text{對照組 OD 值}] \times 100\%$ 。

結果與討論

1. 毛狀根培養系統的建立

1.1 掌葉大黃毛狀根培養系統的建立

將掌葉大黃無菌外植體，利用農桿根群菌 A4 (*Agrobacterium rhizogenes* A4) 或 ATCC 15834 進行感染。感染 5 天後，外植體並無明顯變化 (圖 1 a)。14 天後，可見到毛狀根自傷口處長出 (圖 1 b)。21 天後，在感染處有明顯的毛狀根長出 (圖 1 c)，待長至約 2~3 公分時，將毛狀根切下，單離培養於含有適量抗生素之 MS 培養基上連續繼代數次，直至除菌完全。約 90 天後即可得到單株化且穩定生長的掌葉大黃毛狀根培養系統 (圖 1 d)。

1.2 絞股藍毛狀根培養系統的建立

感染後 7~10 天即可見到毛狀根自傷口處長出，初期呈白色，密集叢生、多根毛、無明顯向地性 (圖 2)。切下長約 2.0~3.0 cm 之毛狀根單離培養，在含有適量抗生素之 MS 培養基上連續繼代數次，直至除菌完全。篩選生長旺盛，分支多且細長的毛狀根進行單株化，毛狀根單株品系以 MS 平板培養基每 4 週繼代培養一次 (圖 3a)。挑選生長快速的毛狀根品系，切取長約 3.0 cm 絞股藍毛狀根尖接種於 MS 液體培養基，於 25 °C 暗處、80 rpm 進行繼代培養 (圖 3b)。

2. 感染之確認

本實驗採用 PCR 確認毛狀根之產生，所設計的三組引子，係分別針對 *A. rhizogenes* 之 Ri 質體 T_L-DNA 上的 *rolB*、*rolC* 及 *virC* 基因所設計的。由圖 (4-1 及 4-2) 可見，農根菌感染絞股藍葉片後產生之毛狀根，經 PCR 放大特定基因片段後，證實 T-DNA 上之 *rolB* (約 540 bp) 及 *rolC* (約 480 bp) 基因已經插入植物染色體 DNA 中，而對照組 (正常根) 則未能檢測出。*virC* 基因本身並不隨 T-DNA

轉移至植物體內，在此作為 negative control，因此在毛狀根中亦未能檢出，證明毛狀根樣品未受菌體 DNA 之污染。

3. 高產性毛狀根品系之篩選

因為每一條毛狀根起源於一個細胞，所以將每一條毛狀根視為一個單株 (Sevón *et al.* 1997)。由於植物細胞合成次級代謝產物的能力是由細胞系決定的，不同細胞系之間合成次級代謝物之能力差異可達數十倍。因此，篩選生長快速且次級代謝物生合成能力強之品系即成為毛狀根培養工業化之前提。

本實驗由52株毛狀根品系中進一步挑選了7株 (GP-01~GP-07) 生長快速、分支多者進行高產性毛狀根系之篩選，同時並比較了不同基礎培養基 (MS、B5) 對毛狀根之生長、總皂甙含量及產量的影響。結果發現7株毛狀根在MS培養基之生長速度均優於B5培養基 (圖5)。因為總皂甙之產量是由單位體積中細胞生長量和單位重量細胞中皂甙含量的乘積決定的，因此雖然在B5培養基培養時，7株毛狀根之總皂甙含量較MS培養基高 (圖6)，但因生物量 (biomass) 較低，致使總皂甙之產量較低，因此從生產的角度仍然選擇了MS培養基作為絞股藍毛狀根之基礎培養基 (圖7)。

4. 細胞增生抑制作用分析

中草藥以其療效廣泛、確切以及毒性低受到國內外的廣泛關注。近年來，從中草藥萃取腫瘤抑制成份日益受到重視。目前多數使用的方法是先選取幾種腫瘤細胞系，以體外細胞培養為實驗模式，檢測中藥萃取物或單體成分的腫瘤抑制作用，篩選出能夠以較低濃度抑制腫瘤細胞生長或增殖的藥物。本計畫已完成之實驗結果顯示，絞股藍毛狀根萃取液在體外試驗中對肝癌細胞株Hep3B具有顯著抑制作用，且存在劑量與時間效應 (表1)。但毛狀根萃取物對腫瘤細胞生長之抑制效果與其總皂甙含量並非成正比關係 (表2及圖7)，此與過去之經驗相違，因此，我們深覺未來仍有進一步探討之必要。

台灣保健食品的市場龐大，使用的人口與日俱增，而保健食品活性之確認研究是其中重要的一環，因此對於其有效成份及活性評估之研究有重要的意義。藉由對絞股藍毛狀根的生理活性評估，在確定其保健效用後，可作為推廣此類保健農產品開發之依據，亦可藉由其活性之確立希望對發展國人使用較為安全之新的保肝、抗腫瘤之保健農產食品之開發有所助益。毛狀根具有生長快速、可離體培養且不需添加外源激素、遺傳性狀穩定並能合成與原植物相同或相似之活性化合物等特點，使毛狀根具有很大的工業化生產潛力。中草藥毛狀根培養技術在藥用植物上的運用是當前中藥產業發展過程中湧現出來的一項新穎技術，目前還未被充分利用，但從台灣當前中藥產業的發展趨勢來看，走出傳統大田栽培限制，實現中草藥工廠化、自動化、規模化生產是必然之路，只有充分利用此一新技術，才能使藥用植物的生產滿足市場及人們身體健康的需求，具有極為廣闊的發展應用前景。

參考文獻

- 姜彬慧、楊萬春、趙余慶(2003)絞股藍抗腫瘤作用研究現狀。中藥材 26: 683-686。
- 楊榮季(1999)認識絞股藍(七葉膽)。長庚醫訓 20: 25-27。
- 劉興祥(1992)大黃的藥理作用及其臨床研究。中國中西醫結合雜誌 12: 571-573。
- Chang CK, Chang KS, Lin YC, Liu SY, Chen CY (2005) Hairy root cultures of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino: A promising approach for the production of gypenosides as an alternative of ginseng saponins. *Biotechnol. Lett.* 27: 1165-1169.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Norberg Å, Hoa NK, Liepinsh E, Phan DV, Thuan ND, Jörnvall H, Sillard R, Östenson C-G (2004) A novel insulin-releasing substance, phanoside, from the plant *Gynostemma pentaphyllum*. *J. Biol. Chem.* 279: 41361-41367.
- Sevón N, Drager B, Hiltunen R, Oksman-Caldentey K-M (1997) Characterization of transgenic plants derived from hairy roots of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell Rep.* 16: 605-611.
- Takemoto T, Arihara S, Nakajima T, Okuhira M (1983) Studies on the constituents of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. I. Structures of gypenoside I-XIV. *J. Pharm. Soc. Jap.* 103: 173-185.
- Thomson D, Henry R (1995) Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *BioTechniques* 19: 394-400.

圖與表

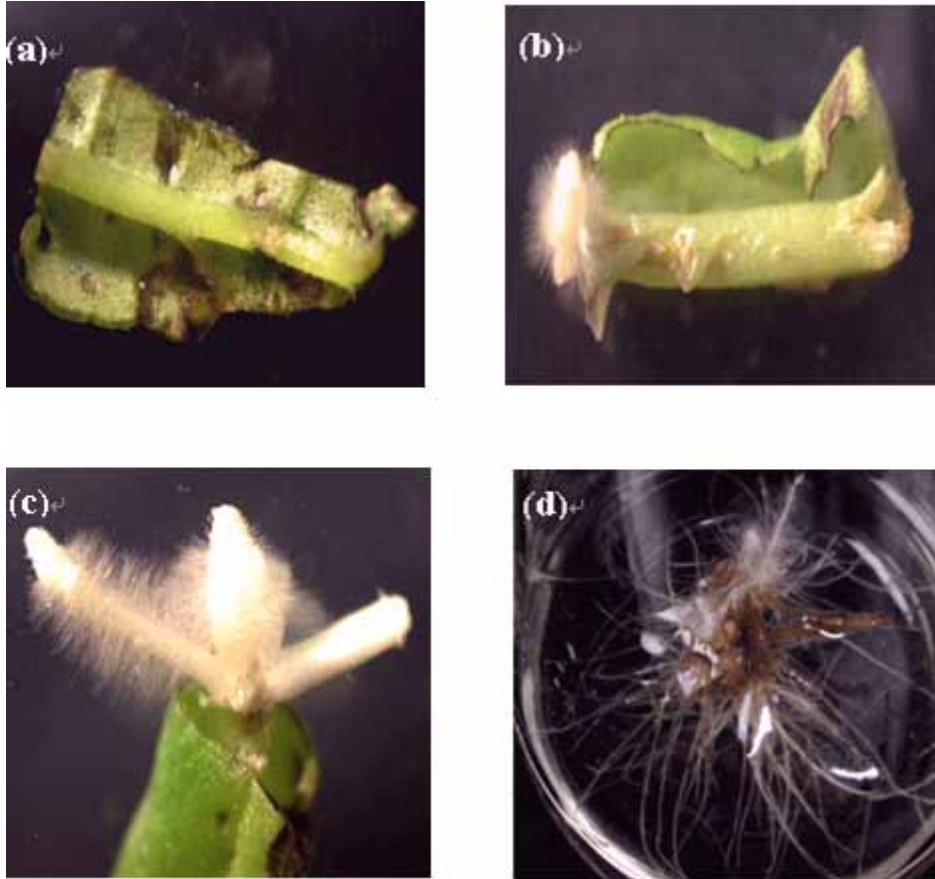


圖 1 掌葉大黃毛狀根之誘導



圖 2 絞股藍毛狀根之誘導

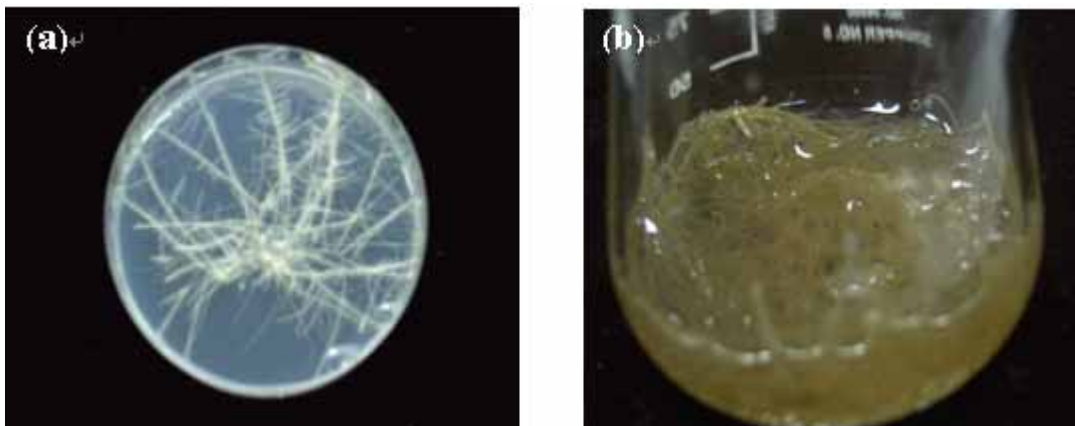


圖 3 絞股藍毛狀根培養系統之建立



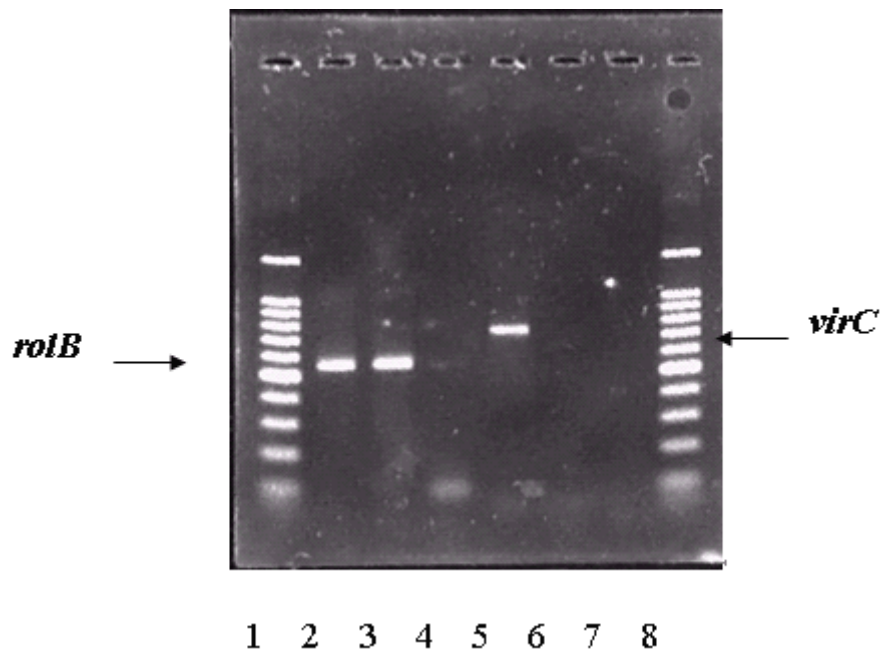


圖 4-1 掌葉大黃毛狀根培養系統之確認

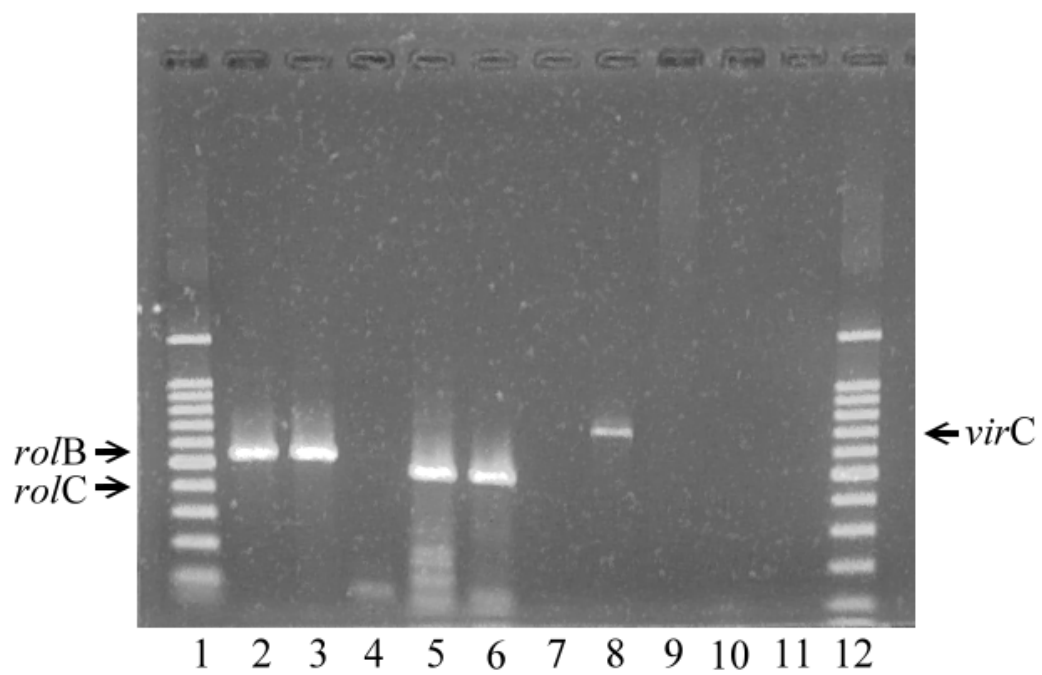


圖 4-2 絞股藍毛狀根培養系統之確認

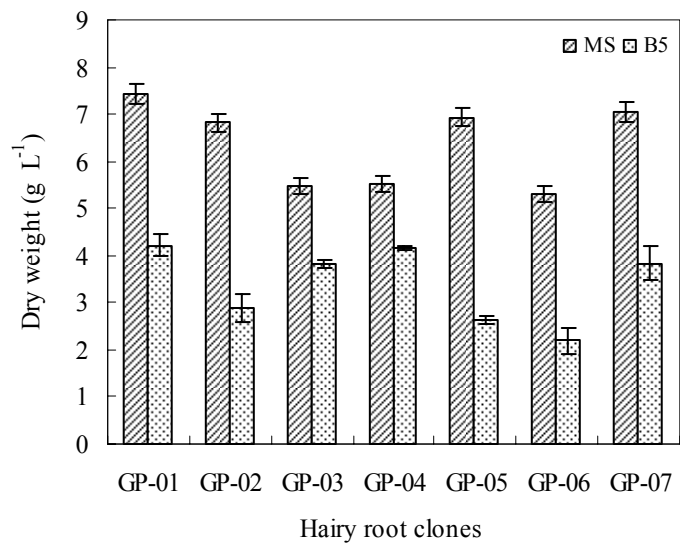
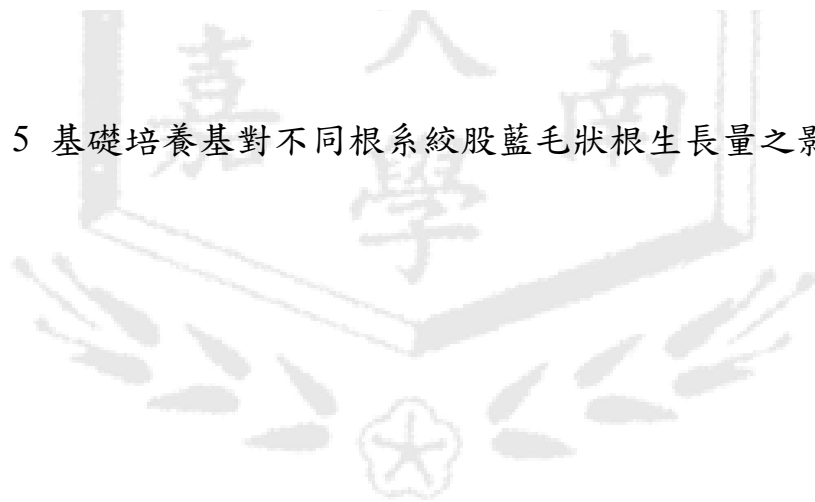


圖 5 基礎培養基對不同根系紋股藍毛狀根生長量之影響



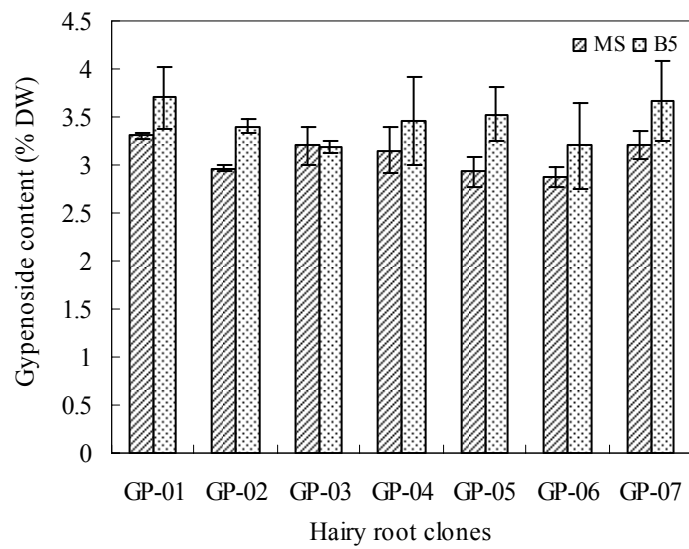
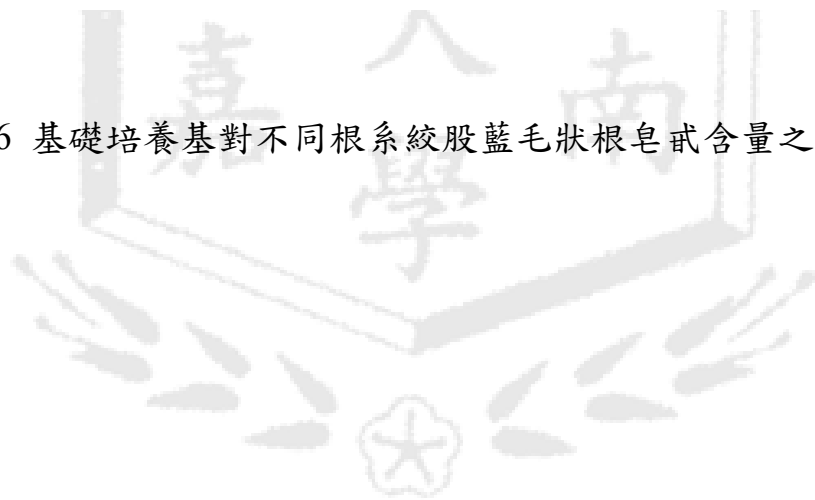


圖 6 基礎培養基對不同根系紋股藍毛狀根皂甙含量之影響



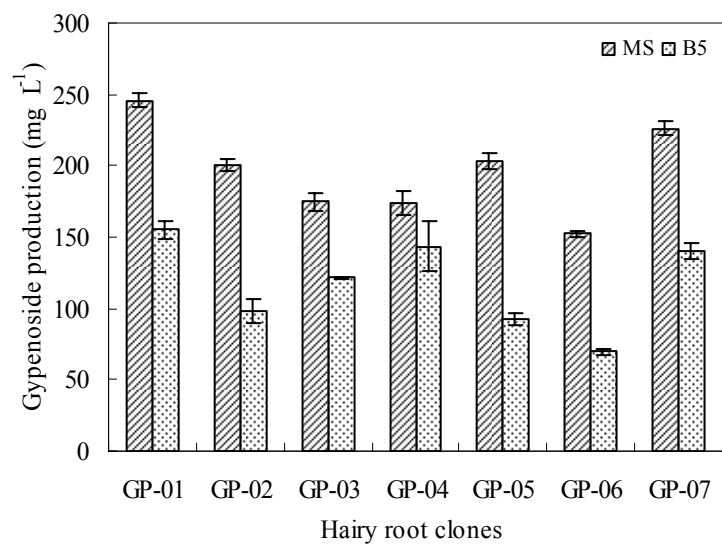


圖 7 基礎培養基對不同根系紋股藍毛狀根總皂甙產量之影響

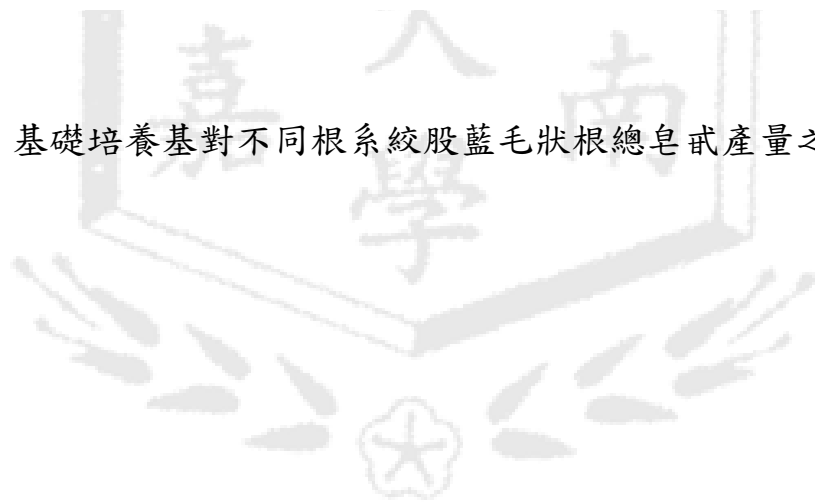


表1 不同根系絞股藍毛狀根萃取液對腫瘤細胞 (Hep3B) 增殖之抑制作用

毛狀根系	終濃度 (μg 生藥/mL PBS)	細胞存活率 (%)	
		48 hours	72 hours
GP-02	100	6.5 ± 0.8	4.1 ± 0.4
	30	56.2 ± 11.4	56 ± 6.4
	10	96 ± 4.7	87.9 ± 6.9
GP-04	100	7.8 ± 0.6	3.7 ± 0.9
	30	47.2 ± 11.8	37.4 ± 15.5
	10	86.6 ± 6.6	96.8 ± 5.4
GP-06	100	7.5 ± 0.6	3.9 ± 0.8
	30	9.2 ± 1.4	5 ± 0.7
	10	84.9 ± 2.3	85.8 ± 0

表2 不同根系絞股藍毛狀根對腫瘤細胞（Hep3B）增殖之抑制作用

材 料	終濃度 (mg生藥/mL PBS)	細胞存活率 (%)
Gypenosides	1	0.4 ± 0.3
GP-01	1	100.9 ± 12.2
GP-02	1	0.6 ± 0.4
GP-03	1	102.5 ± 4.1
GP-04	1	0.6 ± 0.4
GP-05	1	102.6 ± 6.1
GP-06	1	0.8 ± 0.5
GP-07	1	108.3 ± 6.4

