

发酵罐中人参细胞培养条件的研究

TSUTOMU FURUYA 等 (日本东京北里大学药理学系)

我们前已报道人参(*Panax ginseng* C. A. Mayer) 愈伤组织代号Pg-1能产生与栽培人参根同样药理学活性的皂甙—人参甙。

尽管Pg-1中的愈伤组织IBA1(主要是再分化的根)在生产皂甙方面是最优的,不过据认为在悬浮培养过程中所形成的大团块不利于大规模培养,特别是在从悬浮培养转移到悬浮罐或发酵罐培养的情况下。

新分离到的代号Pg-3及低级变异的人参愈伤组织,曾就大规模悬浮培养时有关其生长的培养条件和皂甙产生进行了检测。结果表明Pg-3愈伤组织比Pg-1愈伤组织具有更高的皂甙生产率。

原料和方法

Pg-3 DK和B2K愈伤组织的诱发—1978年12月,取朝鲜产五年生人参根用70%乙醇和普通漂白粉饱和水溶液加以表面消毒,然后用灭菌水漂洗干净。用软木穿孔机除去园柱心(直径1cm)后切成1-2mm薄片。把薄片放在补充有1PPm 2,4-氯苯氧基醋酸(D)和0.1PPm动力精(K)的Murashige和Skoog's(1962)琼脂培养基(以下简称MS)上。将正在生长的愈伤组织(Pg-3)移植至该培养基上,放置暗处保持25°C,每相隔四周继代培养一次(Pg-3DK愈伤组织)。在第三次继代培养后,把愈伤组织转移到含有2PPm吲哚-3-丁酸(IBA)和0.1PPmK的MS上。将愈伤组织放置暗处保持25°C,每相隔四周继代培养一次,约经一年直至获得茁壮生长。

琼脂培养基中生长率及皂甙含量的测定—将愈伤组织(约3克)转移于装有试验培养基100ml锥形烧瓶中,暗处保持25°C、培养四周后,测定生长率及皂甙含量。每次试验应用6-10瓶样品。

悬浮培养物生长率的测定—在装有250ml试验培养基的1000ml锥形瓶中接种琼脂培养基上的愈伤组织,放在往复式振荡器(80次/分,冲程8cm长)上置暗处保持25°C,经培养四周后,收集愈伤组织,测定生长率,每次测定用两瓶样品。

碳和氮源的测定—用加有2ppmIBA和0.1ppmK的MS进行检查,合并检测葡萄糖和蔗糖作为源,氮源是除去NH₄NO₃和加入KNO₃。必要时每种测定重复两次。

发酵罐培养—琼脂培养基上的愈伤组织转移到含有4升试验培养基的5升体积的发酵罐中,充气率是1体积气/每体积培养基/每分钟(VVM),转速是每分钟100次。

琼脂培养基上生长的愈伤组织也转移到含有500ml培养基的1000ml锥形烧瓶中,在往复式振荡器上培养四周。该法培养的细胞用作含25升试验培养基的30升发酵罐的接种物,接种量为24克/升或48克/升,充气率是0.25VVM。三种类型的涡轮机(圆盘式、角度圆盘式及锚式)分别用100和150rpm两种转速测定。

皂甙的提取和测定—用甲醇提取50克新鲜愈伤组织混悬在水中,再用乙醚提取。水层用正丁醇提取,减压蒸发正丁醇层(粗皂甙)。把粗皂甙定量点在硅胶薄层层析板上,用正丁醇—醋酸乙酯—水(4:1:5)上层液展开,喷10%硫酸,加热显色。用双波长扫描器(λ_{obs}=530nm, λ_{ref}=700nm)测定每一斑点的人参甙含量,并计算总皂甙。

结果与讨论

在几种琼脂培养基上培养新分离到的Pg-3DK愈伤组织和B2K愈伤组织(DK愈伤组织的衍生物),测定其生长率和皂甙的含量。Pg-3B2K比DK具有更高的生长率和皂甙含量。这个结果类似于Pg-1D1与IBA1愈伤组织,在补充2PPmIBA和0.1PPmK的MS上的培养物显示了生长率高和皂甙量最高。

当用含2PPmIBA和0.1PPmK的MS作成250ml悬浮液培养Pg-1IBA1愈伤组织时可产生最高的皂甙含量。因此,分别在5升发酵罐中用相同培养基(2PPmIBA和0.1PPmK)悬浮培养Pg-1IBA1和Pg-3B2K愈伤组织,然后

比较生长率和皂甙量,结合果Pg-3B2K愈伤组织几乎与Pg-1IBA1产生同样的干品重量(每100克鲜品重量)和皂甙含量,但是生长率则较低。

用悬浮在含有2PPm IBA和0.1PPm K液态MS中的愈伤组织检查碳、氮源的影响。结果表明在最初两周中,含0.5%葡萄糖2%蔗糖的培养基最有利于生长。若不加入3%蔗糖,培养两周后加入蔗糖可提高生长率,也可增加干品重量。基于这些结果,认为要获得高生长率添加2%蔗糖是最好的。显然高浓度的矿物盐或 NH_4^+ 离子可抑制愈伤组织迅速生长。因此,通过除去 NH_4NO_3 而加入 KNO_3 改良MSO经发现改良MS比普通MS或不加 KNO_3 的MS得到更高的生长率和干品重量。与Gambory's B₅培养基比较改良MS也得较高的生长率,但干品重量类似。虽然培养基含不同浓度 kNO_3 (试验 KNO_3 浓度范围500~6000mg/l),但是生长率是类似的。因此,仅含 KNO_3 1900mg/l(即除去 NH_4NO_3 的MS)作为氮源的培养基用在下述30升发酵罐培养中。

基于上述培养条件(碳和氮源)对摇瓶悬浮培养有影响这一结果,用几种培养基在30升发酵罐中进行了Pg-3B2K愈伤组织的悬浮培养,还测定了生长率,干品重量和总皂甙含量。对于生长率和

皂甙含量,减去 NH_4NO_3 的MS与普通MS相似。用减去 NH_4NO_3 加入0.5%葡萄糖和2%蔗糖的MS培养两周后,又加入2%蔗糖比仅含3%蔗糖的普通MS得到较高的生长率和较高的干品重量(克/升),而皂甙的相对含量仅有轻微下降。

在三种涡轮机类型中,角度圆盘式可最大程度增加生长率和干品重量,但皂甙含量最低。当搅动速度增加到150rpm时,生长率和干品重量下降,而皂甙含量增加,与100rpm搅动速度时皂甙产量(mg/l)相似。

在30升发酵罐培养中,生长率和干品重量并非随着皂甙含量的增加而增高。这表明每次培养的皂甙产量大致相等。发酵罐培养是无法与摇瓶悬浮培养相比拟的。因此需要进一步检查细胞在发酵罐中的培养条件。

由于目前已可能通过连接发酵罐和大容槽之间的管道和阀门来传送愈伤组织,所以生产高产量皂甙能力的Pg-3愈伤组织比Pg-1变异愈伤组织更适合于大规模培养。从Pg-3愈伤组织中反复选择细胞品系及为大量培养所需的新装置工程正在发展之中。

[Journal of Natural Products《天然药物杂志》,47(1):70~75,1984(英文)]

何芬芬节译 张汉明校 苏中武审阅

· 文摘 ·

克服地高辛超量用药的途径

美国医生已报道成功地运用一种新方法治疗地高辛毒性。他们研制了特异的地高辛抗体来逆转有生命危险的地高辛中毒。

这种新技术包括使用从免疫羊中分离获得的地高辛抗体碎片(即Fab碎片)。文献报道,这种抗体对地高辛具有高度的亲和性和特异性。

在一项中心研究中,曾对26名用地高辛(或洋地黄甙)过量中毒而具有生命危险的患者静脉注射Fab碎片,他们对标准的治疗难以奏效。所有患者有严重心律不齐,某些病例还有高血钾。全部患者最初都有效。随后有5人死亡(4人治疗前症状持续过长,1人供给Fab碎片不足),其它21人毒性迅速扭转并完全恢复。作者认为,有许多病例的效果是激动人心的。例如,有一两岁半的儿童偶然服用了10mg地高辛,在这期间并没有发现不良反应。作者相信,这部分是由于应用抗体小碎片降低了免疫原性。

作者相信,如果深入研究证实没有副作用的话,这种治疗方法就可扩展用于一些无生命危险的过量用药严重的病例。

Doherty曾指出,在对新抗体治疗增添适应症之前,重要的是考虑到突然、完全撤药可能出现的危险。他认为,最终有可能通过测定抗体滴度以消除地高辛的毒性作用而同时保留地高辛的治疗作用。

[The Pharmaceutical Journal,《药学杂志》,229(6207):766,1982(英文)]

康震译 贡瑞生校 张紫洞审