

誘引劑對高氏柴胡懸浮細胞生長與柴胡皂苷含量 累積之影響¹

陳威臣² 夏奇鈺² 葉茂生³ 曹進義² 蔡新聲^{4,5}

摘 要

陳威臣、夏奇鈺、葉茂生、曹進義、蔡新聲。2012。誘引劑對高氏柴胡懸浮細胞生長與柴胡皂苷含量累積之影響。台灣農業研究 61:112-123。

高氏柴胡 (*Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang) 懸浮細胞於含有 0.2 mg/L 二氯苯氧基乙酸 (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D) 之 1/2 MS 液態培養基中於低光照下以 100 rpm 轉速培養，細胞之生長在接種後 0-2 週為緩慢生長期，在 2-4 週呈現快速生長期，在培養 4 週後進入生長靜止期。振盪速度試驗結果顯示，80 rpm 較 100 rpm 振盪速率在培養 4 週後，具有較高之細胞生長量。細胞接種密度試驗結果顯示，以 12% 密度接種之細胞生長最佳，接種密度較高 (24%) 或較低 (6%) 的細胞生長表現均較差，但同樣接種密度 (12%) 下，以較大培養容器為佳 (125-mL vs. 250-mL 錐形瓶)。添加誘引劑之試驗結果顯示，在處理 2 週後，所有誘引劑處理之細胞鮮重皆受到顯著抑制；但在細胞乾重方面，酵母抽出物處理與對照組之乾重相較並無顯著差異，僅茉莉酸與高濃度離層酸處理對細胞乾重有顯著抑制之效果，但三種誘引劑處理對懸浮細胞之柴胡皂苷 (saikosaponin a 及 saikosaponin d) 累積均有促進效果，柴胡皂苷含量可提高 1.9-2.0 倍，產量可提高 1.6-1.8 倍。進一步施用 500 mg/L 酵母抽出物作為誘引劑，結果顯示施用 2 週後柴胡皂苷含量較對照組增加 2.1 倍，而柴胡皂苷產量可達對照組之 2.8 倍，顯示在細胞生長後期施用誘引劑並在特定反應時間後收穫細胞，有助於二次代謝產物柴胡皂苷之產生與累積。

關鍵詞：高氏柴胡、藥用植物、懸浮細胞培養、柴胡皂苷、誘引劑。

前 言

柴胡 (Chai-Hu, *Radix Bupleuri*) 為重要之傳統中藥材，中國藥典所列正品柴胡為柴胡屬 (*Bupleurum*) 之北柴胡 (*Bupleurum chinense*) 與

南柴胡 (*Bupleurum scorzonerifolium*)，日本則以三島柴胡 (*Bupleurum falcatum*) 為正品 (Gan 1985; Pan *et al.* 2002)，台灣特有種高氏柴胡 (*Bupleurum kaoi*) 之柴胡皂苷含量及保肝效果

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2666 號。接受日期：101 年 5 月 24 日。
2. 本所生物技術組助理研究員、副研究員、聘用助理研究員。台灣 台中市。
3. 國立中興大學農藝學系教授。台灣 台中市。
4. 朝陽科技大學生物技術研究所教授。台灣 台中市。
5. 通訊作者，電子郵件：hstsay@cyut.edu.tw；傳真機：(04)23304921。

已被證實優於北柴胡與三島柴胡 (Chen *et al.* 2005; Yen *et al.* 2005)。柴胡根部所含之柴胡皂苷 a 與 d (saikosaponin a, d; SSa, SSd) 為具有藥理生物活性的主要物質，近來許多團隊積極針對南柴胡與高氏柴胡之醫療機制加以研究，證實具有優異的保肝、抗 B 型肝炎病毒、抗氧化、消炎、促進腸蠕動與抑制癌細胞增生效果，在現代醫藥學的重要性與日俱增 (Hsu *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004; Cheng *et al.* 2005)。

藥用植物的開發與利用是植物與藥學專家的共同努力目標，在合成藥當道的今日，仍有許多藥物須由傳統植物萃取而來；近年來許多野生藥用植物生長環境遭受破壞已瀕臨滅種；且有鑑於許多藥用植物需特殊環境栽培，或因生育緩慢而無法大量取得，這些因素讓利用離體細胞或器官培養生產二次代謝物成為最佳替代方式 (Nalawade *et al.* 2003; Tripathi & Tripathi 2003; Mulabagal *et al.* 2004)；例如利用細胞培養方式生產紫杉醇 (taxol) (Chang *et al.* 2004) 與喜樹鹼 (camptothecine) (Fulzele *et al.* 2001) 等重要藥物成分，亦已證實此一模式用於商業生產的可行性。

就懸浮細胞培養增殖效率而言，影響因子除培養基組成成分外，振盪速度 (Chueh *et al.* 2000) 與細胞接種密度 (Chang *et al.* 2004) 也是影響之重要因子。Radman *et al.* (2003) 指出，細胞培養時添加誘引劑 (elicitors) 可提高培養細胞之二次代謝物含量。前人研究結果顯示，YE 處理可促進丹參酮 (tanshinones) (Chen & Chen 2000)、人參皂苷 (ginsenoside) (Lu *et al.* 2000) 與紫杉醇 (Wang *et al.* 2001) 含量；Li *et al.* (2003) 指出，添加酵母抽出物 (yeast extract, YE) 之處理則可能導致離層酸 (abscisic acid, ABA) 含量增加，因而促進丹參酮累積。添加茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 或甲基茉莉酸 (Methyl Jasmonate, MJ) 則可增加人參皂苷 (Lu *et al.* 2000)、青蒿素 (artemisinin) (Baldi & Dixit

2008) 與二氫血根鹼 (dihydrosanguinarine) (Cho *et al.* 2008) 的含量。然而，亦有報告指出施用誘引劑會導致細胞生長受到抑制 (Chen & Chen 2000; Li *et al.* 2003)。Chen *et al.* (2005, 2008) 的研究結果顯示，高氏柴胡癒合組織培養 8 週後之柴胡皂苷 SSa 與 SSd 加總含量達約市售品 (北柴胡乾燥根) 的 9%；如何優化此一懸浮細胞培養系統以提高柴胡皂苷的生產，值得吾人進一步研究。本研究首先建立高式柴胡懸浮細胞培養之生長曲線，用以瞭解細胞隨著時間增加的生長量變化，並針對振盪速率與細胞接種密度優化懸浮細胞生長，而後並藉由添加 YE、JA 與 ABA 等誘引劑提高柴胡皂苷產量，逐步建立高氏柴胡細胞懸浮培養生產柴胡皂苷之生產系統。

材料與方法

供試材料與培養條件

取高氏柴胡 (*Bupleurum kaoi*) 瓶苗葉片培養於 1/2 MS (Murashige & Skoog 1962) 基本鹽類添加 0.2 mg/L 2,4-D 及 3% 蔗糖之培養基 (D2 培養基) 以誘導癒傷組織；取 0.5 g 癒合組織切碎後，移入內含 20 mL D2 培養基之 125-mL 錐形瓶中，以 100 rpm 轉速振盪培養，培養基每 3 週更換一次，經 5–6 次繼代培養後，利用篩網 (0.84 mm) 過篩取得大小一致之懸浮細胞作為後續試驗的材料。培養環境為 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 低光照 ($10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)，培養之錐形瓶置於水平迴轉振盪器 (Orbital Shaker, SK-302AB, SanKuan, Taiwan) 以 80 或 100 rpm 轉速進行培養 (Chen *et al.* 2005)。

懸浮培養細胞之生長曲線調查

取 1 mL 沉降體積 (packed cell volume, PCV) 細胞接種於含 24 mL D2 液態培養基之 125-mL 有臂錐形瓶 (總體積為 25 mL)，以 100 rpm 振盪速率進行培養，共培養 25 支有臂錐形瓶，每週利用錐形瓶之側臂調查懸浮細胞之 PCV

值，共培養 5 週。以培養時間為橫座標，PCV 值為縱座標，繪出細胞之生長曲線。

振盪速率與細胞接種密度對懸浮培養細胞生長增殖之影響

將 3 mL PCV 細胞接種於含 22 mL D2 液態培養基之 125-mL 有臂錐形瓶 (總體積為 25 mL)，分別以 80 與 100 rpm 振盪速度培養，每 2 天調查一次 PCV 值至第 28 天。細胞接種密度試驗係利用 3 mL PCV 細胞接種於 125-mL 與 250-mL 錐形瓶，培養總體積在兩種錐形瓶中分別為 25 及 50 mL，細胞接種密度分別為 12% (3 mL/25 mL × 100%) 及 6% (3 mL/50 mL × 100%)；以同樣方式接種 6 mL PCV 細胞於兩種容積之錐形瓶中，接種密度則分別為 24% (6 mL/25 mL × 100%) 及 12% (6 mL/50 mL × 100%)，以 80 rpm 振盪速率進行細胞懸浮培養，於培養 2、3 與 4 週後調查各處理之細胞乾重。

誘引劑對懸浮培養細胞乾重與柴胡皂苷含量之影響

以 3 mL PCV 細胞接種於內含 22 mL D2 液態培養基之 125-mL 錐形瓶，以 80 rpm 振盪速率進行培養，誘引劑於細胞培養 3 週後，分別添加 1 mL YE (500, 1000 mg/L)、JA (0.119, 1.19 mM) 或 ABA (5, 50 μM) 溶液，並以添加 1 mL 無菌水與 0.2% 乙醇溶液作為對照組，再經過 1 週的培養後調查細胞乾重及其柴胡皂苷含量。

酵母抽出物處理時間對懸浮培養細胞乾重與柴胡皂苷含量之影響

以 6 mL PCV 細胞接種於內含 44 mL D2 液態培養基之 250-mL 錐形瓶 (接種密度 12%)，以 80 rpm 振盪速率進行培養，培養 3 週後分別添加 1 mL 之 500 mg/L YE 溶液與無菌水 (對照組)，再繼續培養 1 與 2 週後調查細胞乾重及其柴胡皂苷含量。

柴胡檢品之柴胡皂苷含量分析

柴胡皂苷含量測定以高壓液相層析法 (HPLC 法) 測定 (Chen *et al.* 2008)，方法簡述如下：檢品包括柴胡皂苷標準品 SSa 與 SSd，以及上述處理所得乾燥細胞樣品。標準品係利用甲醇溶解成系列濃度，進樣檢測後製成檢量線；乾燥細胞檢品磨碎後以甲醇為溶劑，經超音波震盪 30 分鐘後以濾紙過濾並收集濾液，重複萃取 3 次且合併濾液，經真空減壓濃縮後再加入甲醇定量，以 0.22 μm 濾膜過濾備用。HPLC 層析條件如下，利用氰化甲烷 (acetonitrile)：水 = 40：60/50：50/40：60 (v/v) 為流動相進行定溫 (35°C) 梯度洗提分析，流速 1 mL/min，紫外線檢定波長為 203 nm，用以分析各檢品 SSa 與 SSd 含量。細胞檢品萃取液重複注射 3 次，每次進樣 10 μL 濾液，並依檢量線的線性迴歸方程式推算各檢品的 SSa 及 SSd 含量。

資料統計與分析

懸浮細胞生長曲線以 25 個有臂錐形瓶細胞 PCV 值的平均值繪製；振盪速率係調查 5 個有臂錐形瓶細胞 PCV 值的平均值；細胞接種密度與誘引劑試驗則是以每處理取樣 3 個錐形瓶進行調查。試驗均採用完全逢機設計 (completely randomized design, CRD) 設計，所得資料經 SAS 8.2 版套裝統計分析軟體進行變方分析 (analysis of variance, ANOVA)，若處理效應顯著 ($P < 0.05$)，則利用最小顯著性差異 (least significant difference, LSD) 測驗比較各處理平均值間之差異。

結 果

培養時間對懸浮培養細胞生長增殖之影響

取 1 mL PCV 之細胞培養於含有 24 mL D2 液態培養基，培養 2 週後之細胞 PCV 值約為 2.97 mL，培養 3 週之細胞 PCV 值達 6.23 mL，最大細胞生長量出現在培養 4-5 週間，其細胞

PCV 值約為 11.5 mL，但此兩週間之細胞 PCV 值並無明顯差異 (圖 1)。

振盪速率與接種細胞密度對懸浮培養細胞生長增殖之影響

將 12% 接種密度之高氏柴胡懸浮細胞分別以 80 及 100 rpm 的振盪速率培養，結果如圖 2 所示。培養前期 (0–14 天) 兩種振盪速率處理之 PCV 值並無明顯差異；培養後期 (15–28 天) 雖然以 80 rpm 振盪速率處理之懸浮細胞 PCV 值較高，但兩處理間仍無明顯差異，直到培養後第 28 天，由於 100 rpm 處理之細胞 PCV 值下降，致使兩處理結果開始呈現差異。在培養 28 天後利用 80 及 100 rpm 振盪速率處理的細胞 PCV 值分別約為 12.5 及 11.2 mL。

細胞接種密度試驗結果如圖 3 所示，當細胞接種密度為 6% (250-mL 錐形瓶) 懸浮細胞無明顯生長，經 4 週培養後細胞呈現褐化狀態。細胞接種密度為 12% (125-mL 錐形瓶) 經 4 週培養後之細胞乾重約為 0.26 g，而同樣

12% 細胞接種密度但培養容器為 250-mL 錐形瓶得到之細胞乾重為 0.51 g。細胞接種密度為 24% (125-mL 錐形瓶) 之懸浮細胞初期生長較為快速，在第 3 週後即可得最大乾重，但在培養 4 週後其細胞乾重與使用相同 125-mL 容器但接種密度為 12% 之處理並無顯著差異。

誘引劑對懸浮培養細胞生長增殖與柴胡皂苷含量之影響

誘引劑試驗結果如表 1 所示，就細胞鮮重而言，處理 1 週後各誘引劑處理之細胞生長與對照組相較均未受到明顯影響，僅 JA 與 ABA 高濃度處理相較於對照組呈現顯著降低 ($P < 0.05$) 的結果；在處理 2 週後，以無菌水對照組之細胞鮮重最高為 4.41 g/瓶，0.2% 乙醇對照組之細胞鮮重次之為 3.81 g/瓶，其餘各誘引劑處理之細胞鮮重介於 1.90–3.42 g/瓶，誘引劑間呈現顯著差異。若再就各誘引劑濃度效應而言，在培養 2 週後僅 1000 mg/L 較 500 mg/L YE 處理在濃度增加時對細胞鮮重有明顯抑

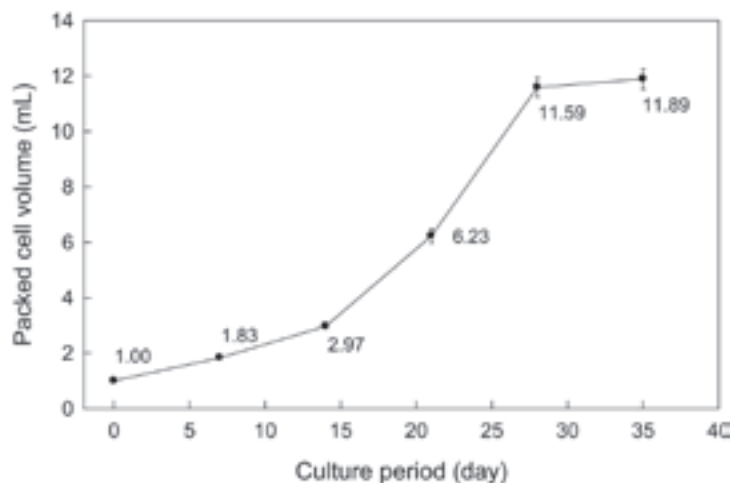


圖 1. 高氏柴胡懸浮細胞之生長增殖曲線。將 1 mL PCV 細胞添加於 24 mL 含有 0.2 mg/L 2,4-D 之 1/2 MS 液態培養基中以 100 rpm 振盪培養 5 週之生長情形，每週取樣調查 5 重複，圖中誤差線為標準誤差。

Fig. 1. Growth curve of cell suspension cultures of *Bupleurum kaoi*. One mL PCV cells were inoculated into a 24-mL 1/2 MS medium containing with 0.2 mg/L 2,4-D. Cultures were incubated at 25°C on a shaker at 100 rpm and 5 flasks were sampled weekly for five weeks to measure the packed cell volume. Vertical bar indicates standard error of mean.

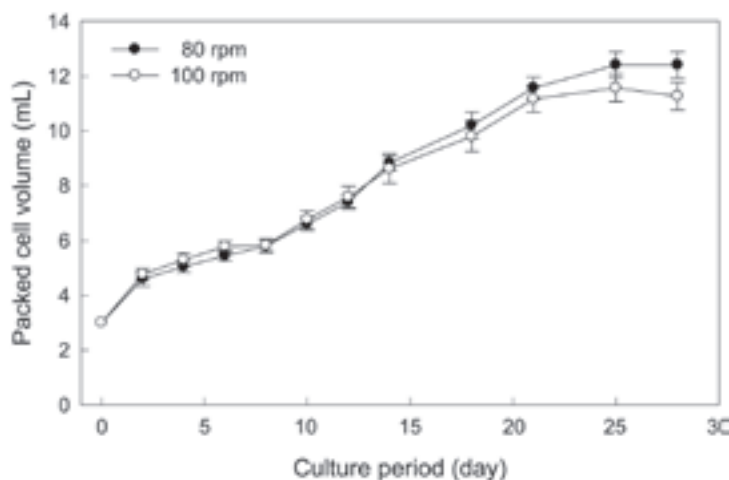


圖 2. 高氏柴胡懸浮細胞於不同振盪速度中生長之情形。接種 3 mL PCV 細胞於 22 mL D2 液態培養基之 125-mL 有臂錐形瓶，每 2 天調查細胞 PCV 值，共培養 4 週之細胞生長情形，每處理調查 3 重複，圖中誤差線為標準誤差。

Fig. 2. Effect of speed of shakers (80 and 100 rpm) on cell proliferation of *Bupleurum koi*. Cells grew in a 1/2 MS basal medium containing 0.2 mg/L 2,4-D. Cultures were sampled at 2-day-interval for 4 weeks, 3 flasks/sampling date/treatment, and measured the packed cell volume. Vertical bar indicates standard error of mean.

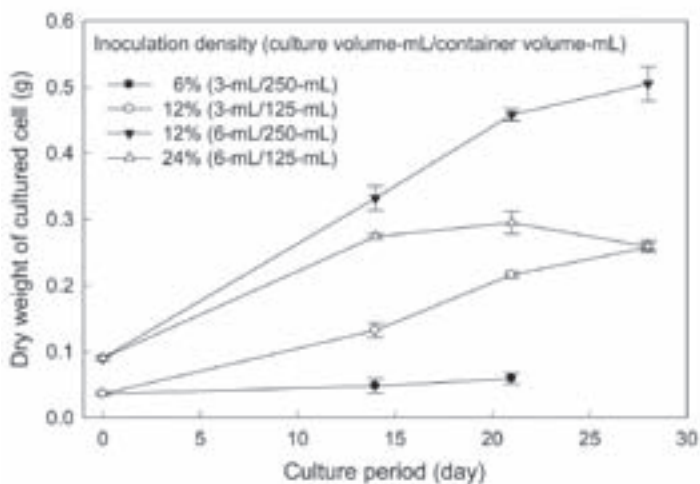


圖 3. 不同細胞接種密度下高氏柴胡懸浮細胞生長之情形。以 3 mL 及 6 mL PCV 接種於 125-mL 或 250-mL 之錐形瓶，兩種容器內之培養總體積分別為 25 mL 及 50 mL。懸浮細胞在培養後第 2、3 及 4 週後調查乾重，每處理調查 3 重複，圖中誤差線為標準誤差。

Fig. 3. Effect of inoculum density on cell proliferation of *Bupleurum koi*. Cells grew in a 1/2 MS basal medium containing 0.2 mg/L 2,4-D. Packed cell volume (PCV) of 3 mL or 6 mL were added into the culture medium to make a total 25 mL culture volume in the 125-mL flask for inoculum density of 12% and 24%, respectively. Larger culture medium volume of 50 mL in the 250-mL flask was also conducted by adding 3 mL or 6 mL PCV cultures to make 6% and 12% inoculum density, respectively. Data of cell dry weight was collected on 2nd, 3rd, and 4th week, 3 flasks/sampling date/treatment. Vertical bar indicates standard error of mean.

表 1. 誘引劑酵母抽出物、茉莉酸與離層酸在添加 1 及 2 週後對高氏柴胡懸浮細胞生長之影響

Table 1. Effect of elicitors on cell proliferation of *Bupleurum kanoi* after 1 and 2 week(s) coculture^z

Elicitor (Con.)	Fresh weight (g/flask)		Dry weight (g/flask)	
	1 wk	2 wks	1 wk	2 wks
Control-1 (H ₂ O)	3.74 ± 0.28 a ^y	4.41 ± 0.20 a	0.40 ± 0.013 a	0.38 ± 0.008 a
Control-2 (0.2% EtOH)	3.29 ± 0.33 a	3.81 ± 0.11 b	0.37 ± 0.024 b	0.36 ± 0.003 b
YE (500 mg/L)	3.49 ± 0.05 a	3.42 ± 0.10 c	0.39 ± 0.004 ab	0.38 ± 0.009 a
YE (1000 mg/L)	3.33 ± 0.36 ab	3.05 ± 0.10 d	0.36 ± 0.016 bc	0.36 ± 0.010 b
JA (0.119 mM)	3.16 ± 0.30 ab	2.07 ± 0.00 f	0.32 ± 0.006 d	0.26 ± 0.006 d
JA (1.19 mM)	3.10 ± 0.40 b	1.90 ± 0.10 f	0.28 ± 0.016 e	0.22 ± 0.002 e
ABA (5 µM)	3.11 ± 0.45 ab	2.86 ± 0.16 e	0.36 ± 0.010 bc	0.36 ± 0.009 b
ABA (50 µM)	2.95 ± 0.28 b	2.81 ± 0.13 e	0.33 ± 0.022 cd	0.34 ± 0.006 c

^z Cultures of *Bupleurum kanoi* were grown in a 1/2 MS basal medium containing 0.2 mg/L 2,4-D for 3 weeks on a shaker at 80 rpm and then treated with various concentration of YE, JA and ABA for 1 or 2 week(s). Autoclaved water (Control-1) and 0.2% EtOH (Control-2) in the medium were used as controls.

^y Values are mean ± standard error and means within a column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test. There were 3 replicate flasks per treatment.

制，提高 JA 與 ABA 濃度對鮮重影響並不顯著。在細胞乾重方面仍以無菌水對照組之細胞乾重較高，誘引劑中以 YE 處理有較高之細胞乾重，ABA 處理次之，而以 JA 處理之細胞乾重最低。

在柴胡皂苷含量方面，表 2 顯示當懸浮細胞培養至第 3 週時之 SSa 與 SSd 加總含量為 0.076 mg/g dry wt (DW)，此時分別進行誘引劑(處理組)、0.2% 乙醇(對照組)與無菌水(對照組)之添加；當懸浮細胞培養至第 4 週時，無菌水對照組之 SSa 與 SSd 之加總含量為 0.098 mg/g DW，而 0.2% 乙醇對照組為 0.092 mg/g DW，三種誘引劑處理組之 SSa 與 SSd 之加總含量均高於對照組，500 mg/L YE、0.119 mM JA 與 5 µM ABA 處理組柴胡皂苷依序約為 0.18、0.19 與 0.20 mg/g DW，分別為無菌水對照組之 1.84、1.94 與 2.04 倍。依柴胡皂苷產量而言，則 500 mg/L YE 與 5 µM ABA 處理效果相當，分別為 3.51 及 3.58 mg/L，約為對照組之 1.79 與 1.83 倍，0.119 mM JA 處理效果次之為 3.04 mg/L，約為對照組之 1.55 倍。

酵母抽出物對懸浮培養細胞生長增殖之影響

以 500 mg/L YE 處理懸浮細胞 1 週及 2 週後對柴胡皂苷誘導累積結果顯示(圖 4)，添加 500 mg/L YE 對於懸浮培養細胞之柴胡皂苷累積確有促進效果，施用 1 週後即可測得細胞之 SSa 與 SSd 加總含量約 0.45 mg/g DW，相較於對照組 SSa 與 SSd 加總含量(0.21 mg/g DW)，增加約 2.14 倍；而 YE 施用達 2 週後其細胞之 SSa 與 SSd 加總含量達 1.67 mg/g DW，約為對照組細胞之 SSa 與 SSd 加總含量(0.6 mg/g DW)的 2.78 倍。

討 論

建立不同物種懸浮細胞培養之生長曲線除有助於了解各別物種細胞之生長習性外，更可利用細胞特有之生長週期決定細胞培養操作策略，例如繼代培養之最佳時期、添加誘引劑時機以及瞭解細胞內二次代謝物累積的情形作為收穫時間的參考等(Chen & Chen 2000; Chueh *et al.* 2000)。本研究結果顯示，高氏柴胡懸浮細胞培養於 D2 液態培養基以 100 rpm 振盪速度於低光照環境中培養，其細胞增殖變化呈 S

表 2. 誘引劑酵母抽出物、茉莉酸與離層酸施用 1 週後對高氏柴胡懸浮細胞內柴胡皂苷含量之影響

Table 2. Content of saikosaponins in cell suspension cultures of *Bupleurum kaoi* after treating with elicitors for 1 week

Treatment ^z	Saikosaponins content (mg/g)			Cell production (B) (g/L)	Productivity (A) × (B) (mg/L)
	SSa ^y	SSd	SSa + SSd (A)		
Control	0.050 ± 0.002 d ^x	0.026 ± 0.006 c	0.076	17.0	1.292
Control-1 (H ₂ O)	0.066 ± 0.006 c	0.032 ± 0.006 c	0.098	20.0	1.960
Control-2 (0.2% EtOH)	0.062 ± 0.003 c	0.030 ± 0.004 c	0.092	19.0	1.748
500 mg/L YE	0.142 ± 0.004 a	0.038 ± 0.003 b	0.180	19.5	3.510
0.119 mM JA	0.134 ± 0.003 a	0.054 ± 0.006 b	0.190	16.0	3.040
5 μM ABA	0.109 ± 0.004 b	0.090 ± 0.006 a	0.199	18.0	3.582

^z Cultures of *Bupleurum kaoi* were grown in a 1/2 MS basal medium containing 0.2 mg/L 2,4-D, on a shaker (80 rpm) for 3 weeks and then treated with elicitors (500 mg/L YE, 0.119 mM JA or 5 μM ABA) for 1 week. Autoclaved water (Control-1) and 0.2% EtOH (Control-2) in the medium were used as controls.

^y SSa: saikosaponin a; SSd: saikosaponin d.

^x Values are mean ± standard error and the means within a column followed by same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test. There were 3 replicate flasks per treatment.

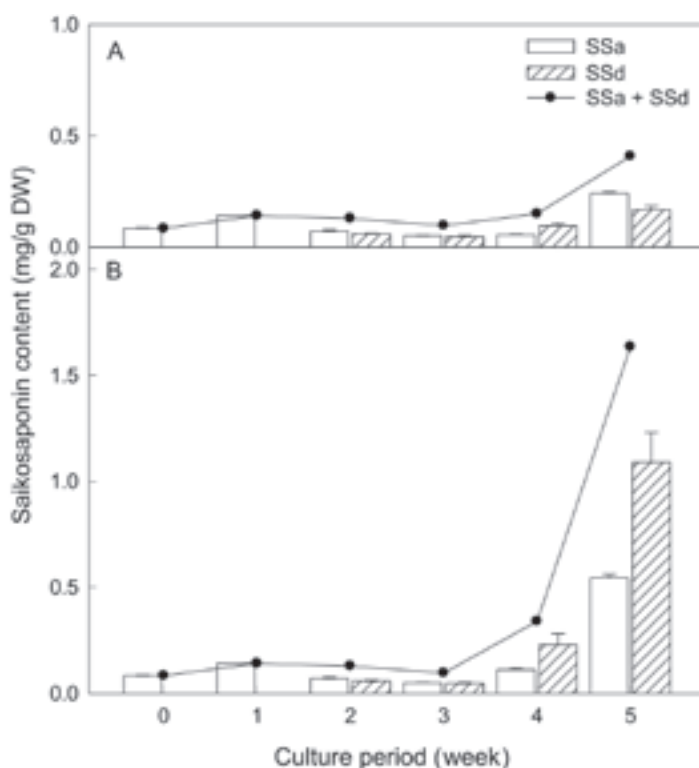


圖 4. 高氏柴胡懸浮細胞培養於添加 0.2 mg/L 2,4-D 之 1/2 MS 基本培養基中 3 週後施用無菌水 (A) 與 500 mg/L YE (B)，繼續培養 1 及 2 週後細胞之柴胡皂苷單位含量之變化，每處理調查 3 重複，圖中誤差線為標準誤差。

Fig.4. Changes of saikosaponins content of *Bupleurum kaoi* in cultures grown in a 1/2 MS basal medium containing 0.2 mg/L 2,4-D for 3 weeks and then treated with autoclaved water (A) and 500 mg/L YE (B) for 1 or 2 weeks. There were 3 replicate flasks per treatment. SSa: saikosaponin a; SSd: saikosaponin d.

型生長曲線 (圖 1)，其中 0–2 週為緩慢生長期 (lag phase)、2–4 週為快速生長期 (log phase) 及 4 週以後之生長靜止期 (stationary phase)，而後細胞即開始呈現褐化現象，因此判斷其繼代培養時間應在培養 3–4 週後較適宜。

振盪速率主要影響液態培養基中氣體的交流，若振盪轉速過慢可能導致培養細胞因氣體交換不足而死亡，振盪速率太快則容易造成細胞間彼此的撞擊而影響生長；此外，懸浮細胞之生長速率也會受到細胞接種密度的影響，接種密度過低，易因缺乏細胞相互間的支持造成細胞生長過於緩慢或死亡；若接種密度太高，則可能因為營養的迅速耗盡，以及空間的不足而無法縮短生長期，達到最高細胞產量，所以尋求適當振盪速率與細胞接種密度對提高懸浮培養的效率十分重要 (Chang *et al.* 1993; Chueh *et al.* 2000)。台灣龍膽 (*Gentiana davidii*) 懸浮細胞於 80–100 rpm 轉速培養時，細胞生長情形最佳，轉速過快 (120 rpm) 或過慢 (60 rpm)，對細胞生長均產生不利影響 (Chueh *et al.* 2000)。Chang *et al.* (1993) 報告指出台灣白芷 (*Angelica dahurica*) 懸浮細胞適合培養於 120 rpm 之振盪速率，其生長速率較以 100 及 80 rpm 培養之細胞為高。本試驗結果顯示高氏柴胡 (*B. kanoi*) 懸浮細胞培養達第 4 週後，80 rpm 振盪處理所得之細胞 PCV 值較 100 rpm 處理為高 (圖 2)，顯示不同物種細胞應有其適合的振盪培養速度。Chang *et al.* (2004) 於台灣紅豆杉 (*Taxus mairei*) 細胞培養研究指出，在 2–5% 低密度 (25–50 g/L) 接種條件下，細胞體積增加效果較佳。Chang *et al.* (1993) 於台灣白芷 (*A. dahurica*) 懸浮細胞培養研究指出，20% (v/v) 細胞接種密度具有最佳增殖效果，較低接種密度培養 (2–4% v/v) 則會延長其生長週期。本研究結果顯示高氏柴胡以 12% 細胞接種密度 (250-mL 錐形瓶)，具有較佳增殖效果，較高 (24%) 或較低 (6%) 的細胞接種密度

均不利於高氏柴胡 (*B. kanoi*) 細胞之生長增殖；另外在相同細胞接種密度 (12%) 條件，以不同大小容器培養之細胞增殖效率也不相同，顯示不僅細胞接種密度會影響細胞培養效率，培養容器的容積大小也是影響細胞增殖的因子之一 (圖 3)。

許多研究報告指出，植物細胞培養過程中添加誘引劑可誘使其二次代謝物產量增加 (Radman *et al.* 2003; Mulabagal *et al.* 2004)。近年來，人參皂苷 (Lu *et al.* 2000)、紫杉醇 (Chang *et al.* 2004)、青蒿素 (artemisinin) (Baldi & Dixit 2008) 與丹參酮 (Chen & Chen 2000) 等重要藥用成分均有利用誘引劑促進培養細胞之藥用成分生產的成功實例。本研究結果顯示，施用 YE、JA 或 ABA 均會促進高氏柴胡懸浮細胞中柴胡皂苷的累積，然而在較高濃度或較長時間處理下，則顯示有抑制細胞生長的結果 (表 1)。誘引劑種類對二次代謝物累積具有不同的效果，添加 YE 可提高丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 細胞之丹參酮含量 (Chen & Chen 2000)。人參皂苷 (Lu *et al.* 2000) 與紫杉醇 (Wang *et al.* 2001) 可因為添加 YE 而大量形成。添加茉莉酸 (JA) 在人參 (*P. ginseng*) 細胞培養中，人參皂苷含量可隨著 JA 濃度的增加而增加 (Lu *et al.* 2000)。Baldi & Dixit (2008) 指出添加甲基茉莉酸 (Methyl Jasmonate, MJ) 於青蒿 (*Artemisia annua*) 細胞培養，對於青蒿素 (artemisinin) 的誘導效果最佳。金英花 (*Eschscholtzia californica*) 之細胞培養則顯示，MJ 對於金英花細胞中二氫血根鹼 (dihydrosanguinarine) 的誘導效果較佳，但血根鹼 (sanguinarine) 累積則以添加 YE 處理最好 (Cho *et al.* 2008)。Li *et al.* (2003) 於丹參細胞培養報告指出，添加 YE 可能導致 ABA 含量增加而使細胞生長受抑制，但卻能提高丹參酮含量。本研究結果亦顯示，直接施用 ABA 對促進高氏柴胡懸浮培養細胞中柴胡皂苷 SSa 與 SSd 的累積效果最

佳，雖然添加 YE 對提高柴胡皂苷的效果稍低於 ABA，但 YE 處理對細胞生長之抑制影響較小，因此在整體柴胡皂苷產量上與 ABA 相近，呼應 Li *et al.* (2003) 之試驗結果 (表 2)。

細胞培養中加入誘引劑雖可增加其二次代謝物產量，但誘引劑亦有可能抑制懸浮細胞的增殖 (Radman *et al.* 2003)。Chen & Chen (2000) 與 Li *et al.* (2003) 研究指出，不當濃度之 YE 與 JA 處理對丹參細胞生長具有相當大的抑制效果，因此對細胞二次代謝的生產而言，誘引劑的最適添加時機是在細胞生長週期中的快速生長後期 (late log phase) 或生長靜止前期 (early stationary phase)，可減少對細胞生長的影響；此外添加誘引劑的劑量與處理時間對於二次代謝物形成也極為重要 (Lu *et al.* 2000; Wang *et al.* 2001)。Chen & Chen (2000) 研究指出，生長快速之丹參細胞系僅含有少量丹參酮，但是當此細胞系培養於含 YE 的培養基後則可大量形成丹參酮，於是建議以兩階段培養 (two-stage cultural process) 方式進行丹參酮大量生產。然而 Lu *et al.* (2001) 研究指出，0–3 g/L YE 於細胞培養之第 1 天即加入，對人參細胞生長並無顯著影響，但在細胞培養達 5、10 及 15 天後再加入 YE，其細胞生長情形均較接種時即加入 YE 之處理為差，MJ 處理也有相似的趨勢。本研究結果顯示 YE、JA 及 ABA 此三種誘引劑處理均會抑制高氏柴胡懸浮細胞生長增殖，其中以 YE 處理對細胞生長的影響較輕微，而 JA 及 ABA 處理對高氏柴胡細胞生長有較大抑制作用 (表 1)；若以柴胡皂苷 SSa 與 SSd 之加總含量來看，顯示三種誘引劑之處理效果相當，且均高於對照組；但以成分產量而言，則 YE 與 ABA 處理效果相當，均較 JA 處理為佳，三種誘引劑處理組之柴胡皂苷產量均高於對照組，顯示三種誘引劑雖然對細胞之生長有影響，但均能促進及提高柴胡皂苷之累積 (表 2)。

本研究後續採用對於細胞生長抑制較輕微的 YE 進行進一步試驗，結果顯示在細胞培養 3 週後施用 500 mg/L YE 對細胞生長並無明顯抑制作用 (資料未列)，但具有促進柴胡皂苷累積之效果，在施用 1 週及 2 週後其細胞之柴胡皂苷含量分別為對照組之 2.14 及 2.78 倍；在圖 4B 中可以看到 YE 處理後 1 週細胞之柴胡皂苷尚未大量累積，處理 2 週後柴胡皂苷大幅上升。上述結果顯示，高氏柴胡細胞懸浮培養可藉由利用細胞生長之中後期施用 YE 誘引劑，並繼續培養 2 週後，提高柴胡皂苷之生產。表 2 結果顯示 500 mg/L YE 處理 1 週後柴胡皂苷含量為 0.18 mg/g，而圖 4 結果顯示在同樣處理時間下之柴胡皂苷含量可達 0.45 mg/g；根據本研究之接種試驗方法與結果顯示，有可能導因於不同容積大小之培養容器，但此推論仍需進一步研究證實。此外，由於 500 mg/L YE 處理 2 週後之懸浮細胞已呈現褐化現象，因此未能持續觀察後續柴胡皂苷累積結果 (圖 4)。

藥用植物建立細胞懸浮培養系統已有眾多例子，然實際應用於商業化生產者卻寥寥可屬，其中有效成分之經濟價值固然是影響能否商業化的主要原因之一，然而植物細胞的低增殖率以及有效成分過低則是需要克服的技術問題。許多研究報告指出，藉由分化器官培養 (differentiated organ culture)、細胞固定化培養 (immobilized cell culture) 與應用生物反應器 (bio-reactor) 生產技術，均是達成增產目標的有效方法 (Gao *et al.* 2001; Tripathi & Tripathi 2003)。本研究結果顯示，雖然藉由目前懸浮細胞培養系統所得之柴胡皂苷含量現階段仍屬偏低，但未來可經由篩選高產細胞系及優化培養條件，以及誘引劑選擇、處理時機與時間等技術及配合培養操作策略，加上利用生物反應器大量培養生產之優點，應有助於利用細胞培養生產柴胡皂苷系統之實用性，此一模式的建立亦可作為其他重要藥用植物相關研究之參考依據。

誌 謝

本研究承虎尾科技大學石麗仙博士對於 HPLC 成分分析相關技術之協助，特此申謝。

引用文獻 (Literature cited)

- Baldi, A. and V. K. Dixit. 2008. Yield enhancement strategies for artemisinin production by suspension cultures of *Artemisia annua*. *Bioresource Technol.* 99:4609–4614.
- Chang, W. D., C. C. Chen, Y. S. Chang, and H. S. Tsay. 1993. Study on tissue culture of *Angelica dahurica* var *formosana* I. callus induction and medium evaluation. *Jour. Agric. Res. China.* 42:253–264. (in Chinese with English abstract)
- Chang, S. H., C. K. Ho, and J. Y. Tsay. 2004. Cell cultures and taxane production of *Taxus mairei*. *Taiwan J. For. Sci.* 19:43–52. (in Chinese with English abstract)
- Chen, U. C., F. S. Chueh, C. N. Hsia, M. S. Yeh, and H. S. Tsay. 2005. Influence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on leaf callus induction, proliferation and saikosaponin formation of *in vitro* *Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang. *Crop Environ. Bioin.* 2:39–49. (in Chinese with English abstract)
- Chen, U. C., C. N. Hsia, M. S. Yeh, C. Y. Tsao, and H. S. Tsay. 2008. Influence of medium components on callus proliferation and saikosaponin content of *Bupleurum kaoi*. *J. Taiwan Agric. Res.* 57:119–132. (in Chinese with English abstract)
- Chen, H. and F. Chen. 2000. Effect of yeast elicitor on the secondary metabolism of Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 19:710–717.
- Cheng, Y. L., S. C. Lee, S. Z. Lin, W. L. Chang, Y. L. Chen, N. M. Tsai, Y. C. Liu, C. Tzao, D. S. Yu, and H. J. Harn. 2005. Anti-proliferative activity of *Bupleurum scorzonrifolium* in A549 human lung cancer cell *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett.* 222:183–193.
- Cho, H. Y., S. Y. Son, H. S. Rhee, S. Y. Yoon, C. W. Lee-Parsons, and J. M. Park. 2008. Synergistic effects of sequential treatment with methyl jasmonate, salicylic acid and yeast extract on benzophenanthridine alkaloid accumulation and protein expression in *Eschscholtzia californica* suspension cultures. *J. Biotechnol.* 135:117–122.
- Chueh, F. S., C. C. Chen, A. P. Sagare, and H. S. Tsay. 2000. Quantitative determination of secoiridoid glucosides in *in vitro* propagated plants of *Gentiana davidii* var. *formosana* by high performance liquid chromatography. *Planta Med.* 66:1–4.
- Fulzele, D. P., R. K. Satdive, and B. B. Pol. 2001. Growth and production of camptothecin by cell suspension cultures of *Nothapodytes foetida*. *Planta Med.* 67:150–152.
- Gan, W. S. 1985. *Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang. p.651. *in: Manual of Medicinal Plants in Taiwan* (Gan, W. S., ed.). National Research Institute of Chinese Medicine. Taipei. 699 pp. (in Chinese)
- Gao, W., L. Fan, E. J. Hahn, and K. Y. Paek. 2001. Pigment and saikosaponin production through bioreactor culture of *Carthamus tinctorius* and *Bupleurum falcatum*. *J. Plant Biotechnol.* 3:1–5.
- Hsu, Y. L., P. L. Kuo, T. C. Weng, M. H. Yen, L. C. Chiang, and C. C. Lin. 2004. The antiproliferative activity of saponin-enriched fraction from *Bupleurum kaoi* is through fas-dependent apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Biol. Pharma. Bull.* 27:1112–1115.
- Li, G. J., S. C. Wang, K. Xia, and X. Zhou. 2003. Effect of yeast elicitor and salicylic acid on the fluctuation of phytohormone contents in Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Plant Growth Regul.* 39:27–32.
- Lu, M. B., H. L. Wong, and W. L. Teng. 2000. Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep.* 20:674–677.
- Mulabagal, V., C. Y. Lee, S. F. Lo, S. M. Nalawade, C. Y. Lin, and H. S. Tsay. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45:1–22.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473–497.
- Nalawade, S. M., A. P. Sagare, C. Y. Lee, C. L. Kao, and H. S. Tsay. 2003. Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44:79–98.
- Pan, S. L., Q. S. Shun, Q. M. Bo, and X. S. Bao. 2002. *The Coloured Atlas of the Medicinal Plants from*

- genus *Bupleurum* in China. Shanghai Scientific and Technical Literature Press, Shanghai. 148 pp. (in Chinese)
- Radman, R., T. Saez, C. Bucke, and T. Keshavarz. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37:91–102.
- Tripathi, L. and J. N. Tripathi. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Trop. J. Pharm. Res.* 2:243–253.
- Wang, B. J., C. T. Liu, C. Y. Tseng, C. P. Wu, and Z. R. Yu. 2004. Hepatoprotective and antioxidant effect of *Bupleurum kaoi* Liu (Chao et Chuang) extract and its fractions fractionated using supercritical CO₂ on CCl₄-induced liver damage. *Food Chem. Toxicol.* 42:609–617.
- Wang, C., J. Wu, and X. Mei. 2001. Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:404–410.
- Yen, M. H., T. C. Weng, S. Y. Liu, C. Y. Chai, and C. C. Lin. 2005. The hepatoprotective effect of *Bupleurum kaoi*, an endemic plant to Taiwan, against dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 28:442–448.

Influence of Elicitors on Cell Proliferation and Saikosaponin Production of *Bupleurum kaoi* in Suspension Culture¹

Uei-Chern Chen², Chi-Ni Hsia², Mau-Shing Yeh³, Chin-Yi Tsao²,
and Hsin-Sheng Tsay^{4,5}

Abstract

Chen, U. C., C. N. Hsia, M. S. Yeh, C. Y. Tsao, and H. S. Tsay. 2012. Influence of elicitors on cell proliferation and saikosaponin production of *Bupleurum kaoi* in suspension culture. *J. Taiwan Agric. Res.* 61:112–123.

Bupleurum kaoi, a native medicinal plant in Taiwan which contains saikosaponins higher than other commercial *Bupleurum* species, was chosen for producing saikosaponins *in vitro*. Cell suspension cultures of *B. kaoi* were cultured in a half-strength MS liquid medium containing 0.2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and used for studying effect of speed of shaker, size of flasks and inoculum density on cell proliferation as well as studying effect of elicitors, yeast extract (YE), abscisic acid (ABA), and jasmonic acid (JA), on saikosaponin production. Results showed that cell proliferation of *B. kaoi* in suspension cultures was higher using shaker speed at 80 rpm than that of 100 rpm with peak period of cell growth at 3–4 weeks. Cell proliferation of *B. kaoi* was also affected by inoculum density and flask size, with the optimum inoculum density of 12% by adding 6 mL packed cell volume (PCV) cultures in 250-mL flasks. Three elicitors (YE, ABA, and JA) tested in 3-week-old suspension cultures of *B. kaoi* were found reducing cell fresh weight and dry weight significantly. However, one week after the treatments of elicitors, saikosaponin contents and its productivity increased 1.9–2.0 folds and 1.6–1.8 folds, respectively. Further study using 500 mg/L YE as elicitor in cultures of *B. kaoi* for two weeks, similar increasing tendency on saikosaponin contents and its productivity was found with 2.1-fold and 2.8-fold, respectively. This study concludes that adding 500 mg/L YE into cell suspension cultures of *B. kaoi* after the lag phase of cell cycle for one to two weeks would not reduce cell growth but increase saikosaponin production.

Key Words: *Bupleurum kaoi*, Medicinal plant, Cell suspension culture, Saikosaponin, Elicitor.

-
1. Contribution No. 2666 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: May 24, 2012.
 2. Respectively, Assistant Researcher, Researcher, Assistant Researcher, Biotechnology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Professor, Graduate Institute of Biotechnology, Chaoyang University of Technology, Taichung, Taiwan, ROC.
 5. Corresponding author, E-mail: htsay@cyut.edu.tw; Fax: (04)23304921.