

台灣黃蘗細胞懸浮培養生產小蘗鹼之研究¹

劉季函² 賴瑞聲³ 李宏謨⁴ 吳明哲^{3,5}

摘 要

劉季函、賴瑞聲、李宏謨、吳明哲。2012。台灣黃蘗細胞懸浮培養生產小蘗鹼之研究。台灣農業研究 61:196–208。

黃蘗藥材來源為芸香科 (Rutaceae) 黃蘗屬 (*Phellodendron* spp.) 植物之樹皮，具有清熱解毒、消炎止痛、滋陰通便的功效，黃蘗樹皮含有小蘗鹼 (berberine)，為西藥製劑的重要原料，廣泛被使用於治療腸胃炎、細菌性痢疾等。台灣黃蘗 [*Phellodendron amurense* Rupr. var. *wilsonii* (Hayata & Kanehira)] 為台灣特有種，小蘗鹼含量高，是黃蘗藥材優異來源，但須生長 6–8 年才可利用，且原生地已過度採集，因此，建立台灣黃蘗懸浮細胞培養系統，是生產小蘗鹼的另一選擇。本研究以台灣黃蘗幼株為材料，進行癒合組織誘導，並探討建立台灣黃蘗細胞懸浮培養之條件，並以小蘗鹼含量為評估指標。結果顯示癒合組織誘導以葉柄為最佳培植體，經暗處理培養於 0.5 mg/L 2,4-D、1.0 mg/L BA 之 MS 基礎鹽類培養基時，可於 28 天後誘導出癒合組織 (callus)，其型態為淡黃色、質地鬆軟、較鬆散，適合作為懸浮細胞培養來源。懸浮細胞培養以 WPM 培養基添加 0.5 mg/L 2,4-D 及 1.0 mg/L BA 為基礎培養基，於黑暗中以 100 rpm 轉速震盪培養，生長 20 天時細胞生長量可達 9 倍，但癒合組織及前述懸浮細胞培養經 75% 乙醇萃取及 HPLC 檢測分析皆無小蘗鹼含量。本研究於懸浮細胞培養第 18 天添加 2 mg/L BA 及 6 mg/L NAA 可順利誘導小蘗鹼生成，於第 28 天時懸浮細胞之小蘗鹼含量為 188.68 $\mu\text{g/g dw}$ ，本研究可作為台灣黃蘗懸浮細胞培養量產小蘗鹼之基礎，懸浮細胞如以不同生產調節劑處理，也可能誘導出棕櫚鹼及黃蘗鹼等其他藥用成分，具有製藥應用潛力。

關鍵詞：台灣黃蘗、癒合組織、懸浮細胞、小蘗鹼、高效液相層析。

前 言

黃蘗習稱黃柏，為傳統中藥材，常用於健胃整腸劑，治腹痛、消化不良、細菌性腸

炎、痢疾、結核性腹瀉，也用為解熱劑、外用消炎劑及洗眼劑 (Tu *et al.* 1995; Chiu & Chang 1999)，藥材主要來源為芸香科 (Rutaceae) 黃

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2671 號。接受日期：101 年 6 月 5 日。
2. 中臺科技大學藥物科技研究所研究生。台灣 台中市。
3. 本所生物技術組助理研究員、研究員兼組長。台灣 台中市。
4. 中臺科技大學校長。台灣 台中市。
5. 通訊作者，電子郵件：wu@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302806。

蘗屬 (*Phellodendron* spp.) 植物之樹皮，供藥材使用有 5 種，包括黃蘗 (*Phellodendron wilsonii* Hayata et Kanehira *amurense* Rupr.)、黃皮樹 (*Phellodendron chinense* Schneid.)、日本黃蘗 (*Phellodendron japonica*)、川黃蘗 (*Phellodendron sacholiinense*) 以及台灣黃蘗 [*Phellodendron amurense* Rupr. var. *wilsonii* (Hayata & Kanehira)] (Kan 1986; Liao 2000)，其中黃蘗俗稱關黃蘗，大陸習稱黃柏；黃皮樹俗稱川黃蘗，市售黃蘗藥材以黃蘗 (*P. wilsonii*) 來源為主。

黃蘗樹皮含多種生物鹼，包括小蘗鹼 (berberine)、棕櫚鹼 (palmatine)、木蘭花鹼 (magnoflorine)、黃蘗鹼 (phellodendrine) 及藥根鹼 (jatrorrhizine) 等，另含無氮素之結晶性物質，如黃蘗酮 (obacunone)，以及脂肪、固醇類化合物等 (Chiu & Chang 1999)，其中小蘗鹼也是西藥氯化小蘗鹼及硫酸鹽小蘗鹼製劑的重要原料，具有抗發炎、抑制細菌、抗癌症等作用，因此一般以小蘗鹼含量來做為評價黃蘗品種優劣的標準，在多種黃蘗藥材來源中，以台灣黃蘗 (又稱本黃蘗) 品質最好，小蘗鹼含量高於其他種約 2.5 倍之多，因此台灣黃蘗頗受國外製藥廠的喜好 (Tu *et al.* 1995; Chiu & Chang 1999)。

台灣黃蘗為台灣特有種，主要分佈於台灣東部、北部與中部海拔 1800–2600 m 間之溫帶林內，如太平山、阿里山、合歡山等地，因市場需求而過度採集，野外已甚為少見，屬於保育類木本植物，又每年製藥工業所需的小蘗鹼類大部分仰賴進口，浪費不少外匯，為提倡森林副產物的開發利用，並且供應中藥藥材、製藥工業原料，台灣黃蘗造林及人工培育具有發展潛力，然而，台灣黃蘗利用部位為樹皮，從栽培至可供藥用需費時 6–8 年，是發展瓶頸之一，利用組織培養生產小蘗鹼等次級代謝物是另一選項，可減輕由野外棲地採集野生植物的壓力 (AboEl-Nil 1997)。

運用植物組織培養來產生次級代謝產物，被認為是一種可大量生產之技術，目前常用的培植體包括毛狀根、癒合組織 (callus) 及懸浮細胞 (cell suspension) 培養，培養物及生產的標的物質具有一致性。懸浮細胞生長速度比癒合組織快，細胞與培養基的接觸面比較均勻，細胞大小及生理代謝狀況比較一致，可用於培養大量之植物細胞，極適合用來進行探討細胞生理代謝及生產次級代謝物，生長周期在人工控制條件下，可採用科學方法提高產量與品質 (Tsay 1984; Su *et al.* 1990)，相關控制因子包括 (1) 物理因子，如光照、溫度、pH 值及通氣等；(2) 生物因子，如遺傳基因、細胞株篩選及組織細胞的年齡；(3) 化學因子，如無機鹽類、醣類、賀爾蒙及生長調節劑等。

利用組織培養生產小蘗鹼，一般多以草本植物如東亞唐松草 (*Thalictrum minus*) (Nakagawa *et al.* 1984; Nakagawa *et al.* 1986)、日本黃連 (*Coptis japonica*) 及洋小蘗 (*Berberis aquifolium*) 或其同屬植物為主；培養基則以 LS 為基礎鹽類，添加 100 μ M NAA 及 5–10 μ M BA，轉速為 100 rpm，並於 25°C 之暗環境下，進行細胞懸浮培養，經 2–3 週後，可得 400–800 mg/L 小蘗鹼 (Ho *et al.* 2005)。Tai (1996) 指出台灣黃蘗癒合組織之誘導以葉柄最佳，於 MS 培養基中添加 2 mg/L 2,4-D、1 mg/L BA、3% sucrose 及 1.0% agar (Difco Bacto agar)，pH 5.7 \pm 0.1，培養於 25 \pm 1°C、相對溼度 70%、暗處理之環境中，培養約 28 天可誘導出癒合組織，而台灣黃蘗癒合組織之繼代培養可使用 WPM 基本鹽類、添加 2.0 mg/L 2,4-D、1 mg/L BA、1000 mg/L casein hydrolysate、10% coconut milk、3% sucrose 及 1% agar，pH 5.2，並每 10–20 天繼代一次，然而，台灣黃蘗細胞懸浮培養，則無相關之具體研究報告。Tzeng (2006) 以細葉十大功勞懸浮細胞進行小蘗鹼生產研究，以 MS 基本鹽類添加 0.5 mg/L 2,4-D 及 3% sucrose，pH

值 5.2 之液態培養基，於 100 rpm 轉速之條件下培養，培養第 32 天可達 10.6 倍細胞體積增殖量，小蘗鹼乾重含量為 158.33 $\mu\text{g/g}$ 。

基於台灣黃蘗具有優良黃蘗藥材特色，小蘗鹼含量優於其他黃蘗物種，並具有黃蘗酮等潛力活性成分，因此本試驗擬以台灣黃蘗為材料進行組織培養研究，以癒合組織誘導基礎，再以生產小蘗鹼為標的，進行台灣黃蘗懸浮細胞培養系統建立，並探討培養基種類及生長調節劑等條件對懸浮細胞生長及小蘗鹼合成的影響，期能建立台灣黃蘗細胞培養系統，據以提高台灣黃蘗懸浮細胞之小蘗鹼產量，可作為小蘗鹼製藥產業的來源。

材料與方法

材料來源

本研究使用之台灣黃蘗 [*P. amurense* Rupr. var. *wilsonii* (Hayata et Kanehira)] 種子，是由林業試驗所自宜蘭太平山區採集，並經預措處理後提供發芽種子，種植於農業試驗所溫室內，以生長 2 個月後之新生苗作為材料來源，供後續無菌苗培養、癒合組織誘導及細胞懸浮培養之建立。

培植體消毒處理

莖段或葉片以清水洗淨後，用 75% 酒精擦拭作表面消毒，再以 0.6% NaOCl (每 50 mL 加 Tween 20 一滴)，手搖震盪方式消毒 10 分鐘後，用無菌水清洗三次後備用。

台灣黃蘗芽體無菌培養

取台灣黃蘗新生植株莖頂以下 3 cm 處之莖段，經消毒處理後分切為 1.5 cm 莖段。以 MS 培養基添加 3% 蔗糖為基本配方，先用 1 N NaOH 或 HCl 將 pH 值調至 5.7 ± 0.1 ，再加入 1.0% 洋菜 (Difco Bacto agar) 加熱溶解，每一試管 (25 mm \times 120 mm; Pyrex, 日本) 注入 10 mL 培養基，以 121°C 、 1.21 kg/cm^2 高壓滅菌 15 分鐘後，擺成斜面冷卻後進行莖段之固態培

養，置於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $38 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ 光照 16 小時條件下進行無菌芽體誘導。

台灣黃蘗癒合組織之誘導

取嫩葉經消毒後分為中肋、葉片及葉柄培植體，分別切取大小各 0.8 cm 左右，進行癒合組織之誘導。以 MS 無機鹽培養基添加 1.0 mg/L BA 及 0.5 mg/L 2,4-D，pH 值 5.7 ± 0.1 ，再加入 1.0% 洋菜進行固態培養，每一試管接種 2 個培植體，每種培植體處理共培養 10 試管，於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 之恆溫下進行暗培養，培養 10 週後觀察癒合組織之外觀、顏色、軟硬度篩選優良癒合組織，並以 HPLC 分析其小蘗鹼含量。

癒合組織生長曲線建立及繼代時間探討

以 WPM 基礎鹽類添加 1.0 mg/L BA 及 0.5 mg/L 2,4-D，pH 值 5.7 ± 0.1 ，並加入 1.0% 洋菜為培養基，使用培養皿 (90 mm \times 15 mm; PRO TECH, 台灣) 內含約 25 mL 培養基進行固態培養，於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 之恆溫下進行暗培養。將誘導篩選出之癒合組織分別以總重 0.5 g、1.0 g 分成 10 等份，並於第 5、10、12、14、16、18、20、25、30 天取樣測定重量，並繪製生長曲線，以求出癒合組織最佳之繼代時間。

台灣黃蘗細胞懸浮培養之建立

建立懸浮細胞母瓶：以 WPM 基礎鹽類添加 1.0 mg/L BA 及 0.5 mg/L 2,4-D 為培養基，pH 值 5.2 ± 0.1 ，將葉柄誘導之癒合組織 0.5 g 切碎，置於含 20 mL 液體培養基之 125 mL 三角瓶內，以 80 rpm 進行平面迴轉式震盪培養，每周更換培養基 1 次，培養環境為 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 恆溫暗處理。

建立懸浮細胞生長曲線：培養基同前項，取 1.5 mL (約 1.0–1.2 g) 懸浮細胞置於內含約 20 mL 液體培養基之 125 mL 長臂三角錐形瓶 (De-long flask) 內，重複次數為 12 瓶，以 100 rpm 進行震盪培養，培養環境為 $25 \pm 1^\circ\text{C}$

恆溫暗處理。於第 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45 天測量細胞沉降體積 (packed cell volume, PCV)，並繪製生長曲線。

懸浮細胞量化生長最適量：分別取懸浮細胞鮮重各 10、30、50 g，置於內含 40 mL 原液與 160 mL 新鮮培養基之 1000 mL 三角錐形瓶中，以 100 rpm 進行震盪培養，培養環境為 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 恆溫暗處理。14 天後以 400 mesh 篩網過濾秤鮮重，評估最適細胞量與培養基體積比例。

植物生長調節劑處理

為評估植物生長調節劑 BA、NAA 及 IBA 對懸浮細胞小蘗鹼含量影響，將鮮重 5 g 懸浮細胞，置於內含 20 mL 原液和 80 mL 新鮮 WPM 培養基之 500 mL 三角錐形瓶中，於培養第 18 天後進行下列 4 種處理：(1) 添加 6 mg/L NAA 及 2 mg/L BA；(2) 添加 6 mg/L IBA 及 2 mg/L BA；(3) 未添加 NAA、IBA、BA 之正常懸浮細胞；(4) 未添加 NAA、IBA、BA 之已褐化懸浮細胞，各 3 重複，於第 28 天後以 400 mesh 篩網過濾取懸浮細胞，經冷凍乾燥後取約 0.5 g 進行小蘗鹼萃取及 HPLC 分析。

小蘗鹼萃取、分析方法與檢量線製作

不同溶劑萃取效益評估：以市售之黃蘗為材料，經冷凍乾燥後以粉碎機磨碎，分別以 99.5% 甲醇、95% 乙醇、75% 乙醇、100% H_2O 共 4 種溶劑進行小蘗鹼萃取，評估不同溶劑之萃取效益。秤取約 0.02 g 粉末置於 50 mL 離心管中，第一次加入 20 mL 萃取溶劑，並經超音波震盪 60 分鐘後，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘取上清液至另一離心管，殘渣再加入萃取溶劑 10 mL，並經超音波震盪 30 分鐘後再次離心取上清液，殘渣第三次加入 5 mL 萃取溶劑，經超音波震盪 30 分鐘後離心取上清液，合併三次上清液以萃取溶劑定量成 35 mL，取 1 mL 萃取液用 0.45 μm 濾膜 (Millipore) 過濾後進行 HPLC 分析，每一萃取溶劑重複 3 次 (Su

et al. 1990; Iwasa *et al.* 1998)。

癒合組織與懸浮細胞之萃取：經前項分析以 75% 乙醇為較佳萃取溶劑，因而以 75% 乙醇進行後續萃取。癒合組織或懸浮細胞經冷凍乾燥，以粉碎機磨碎為樣品，取 0.5 g 粉末置於 50 mL 離心管中，後續萃取處理同前項 (Su *et al.* 1990; Iwasa *et al.* 1998)。

懸浮細胞培養液之萃取：取台灣黃蘗懸浮培養液 20 mL，經減壓濃縮乾燥，加入 5 mL 75% 乙醇萃取，並經超音波震盪 60 分鐘後，取 1 mL 萃取液用 0.45 μm 濾膜過濾後進行 HPLC 分析。

標準品製備及檢量線製作：鹽酸小蘗鹼成分標準品購自 Sigma 公司，精稱鹽酸小蘗鹼 10 mg 溶於 99.5% 甲醇，以定量瓶定容至 100 mL 為母液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，分別取母液 1、2、3、4 及 5 mL，再用甲醇定容至 10 mL，製得 10、20、30、40 及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之標準溶液，以 0.45 μm 濾膜過濾後進行 HPLC，以製作小蘗鹼檢量線與迴歸方程式。

小蘗鹼高效液相層析 (HPLC) 分析：所用高效液相層析儀為 WatersTM Alliance 2695 系統，搭配自動進樣器 WatersTM 717 plus Autosampler，偵測器為 WatersTM 900 Controller Photodiode Array Detector，分析管柱為 Inertsil[®] ODS-3 (C18, 4.6 mm i.d \times 250 mm, 5 μm)，保護管柱為 Guard-PakTM。分析條件為：移動相 H_2O 500 mL/Acetonitrile 500 mL/ KH_2PO_4 3.4 g/SDS 1.7 g，流速 1.0 mL/分鐘，管柱溫度控制 30°C ，偵測波長為 343 nm。

統計分析

生長曲線變化數據結果以平均值 (mean)、標準差 (standard deviation, SD) 呈現。小蘗鹼標準品經 HPLC 分析後，以 WatersTM 液相層析儀附加之 EmpowerTM 3 套裝軟體建立檢量線，所用參數為小蘗鹼波峰面積及含量。其餘資料採用 SPSS 統計分析套裝軟體 (17.0 版，

參考文獻即使用手冊引用來源) 進行變方分析 (ANOVA) 後, 以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test, LSD test), 在 5% 顯著水準下比較各處理平均值之差異。

結 果

台灣黃蘗芽體無菌培養

由種子育苗之台灣黃蘗新生植株, 經生長 2 個月後, 其生長高度大約為 15 cm, 其葉片寬度約 1.5 cm, 長度約 5.0 cm, 取新生植株莖段, 進行芽體誘導生長與增殖, 可順利獲得無菌苗, 移至培養瓶內生長良好 (圖 1), 所得無菌組培苗可應用於大量繁殖試驗之培植體來源, 或作為癒合組織誘導之材料來源。

台灣黃蘗癒合組織之誘導

以生長 2 個月之新生植株嫩葉作為材料, 分別以葉片、中肋及葉柄進行癒合組織誘導 (圖 2), 結果顯示約 28 天後可誘導出癒合組織, 且以葉柄部位誘導之癒合組織外觀顏色較佳, 呈淡黃色且組織柔軟, 因此, 後續以此癒合組織作為繼代培養之材料, 並改以 WPM 為基本鹽類, 添加 0.5 mg/L 2,4-D、1.0 mg/L BA、1000 mg/L casein hydrolysate、10% coconut milk、3% sucrose 及 1% agar, pH 5.2 為繼代培養基。

將篩選出之癒合組織分別以初始鮮重 0.5 g 及 1.0 g 培養於 25 mL 固體培養基, 生長情形隨天數變化如圖 3, 定期取樣秤鮮重並繪製癒

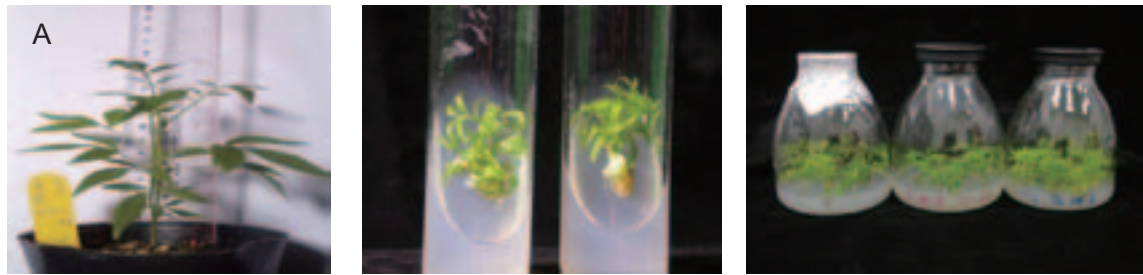


圖 1. 以台灣黃蘗 2 個月大新生植株之莖段誘導生產無菌瓶苗。(A) 生長 2 個月之實生苗植株；(B) 莖段誘導 1 個月之芽體；(C) 移植 1 個月後之無菌瓶苗。

Fig. 1. Shoot proliferation of *Phellodendron amurense* Rupr. var. *wilsonii* induced from stem cuttings (B, C) of 2-month-old seedlings (A). (A) A 2-month-old seedling; (B) Shoots induced from stem cuttings after incubation on MS medium for one month; (C) Shoots transplanted on MS medium for one month.

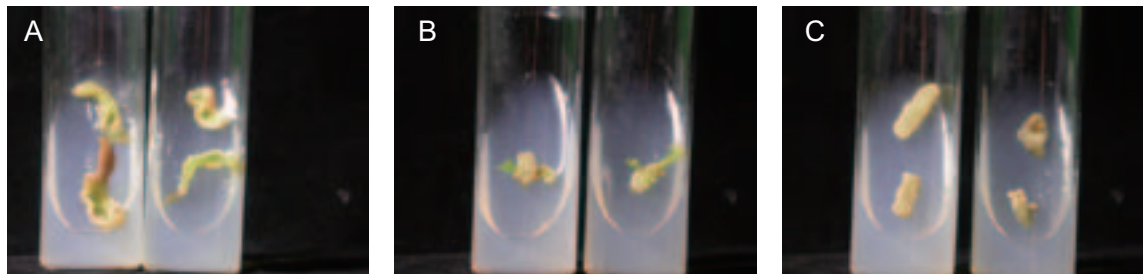


圖 2. 台灣黃蘗幼苗葉片不同部位之癒合組織誘導情形。(A) 葉片；(B) 中肋；(C) 葉柄。

Fig. 2. Induction of callus formation of *Phellodendron amurense* Rupr. var. *wilsonii* from different parts of leaves. (A) leaf blade; (B) midrib; (C) leaf petiole.

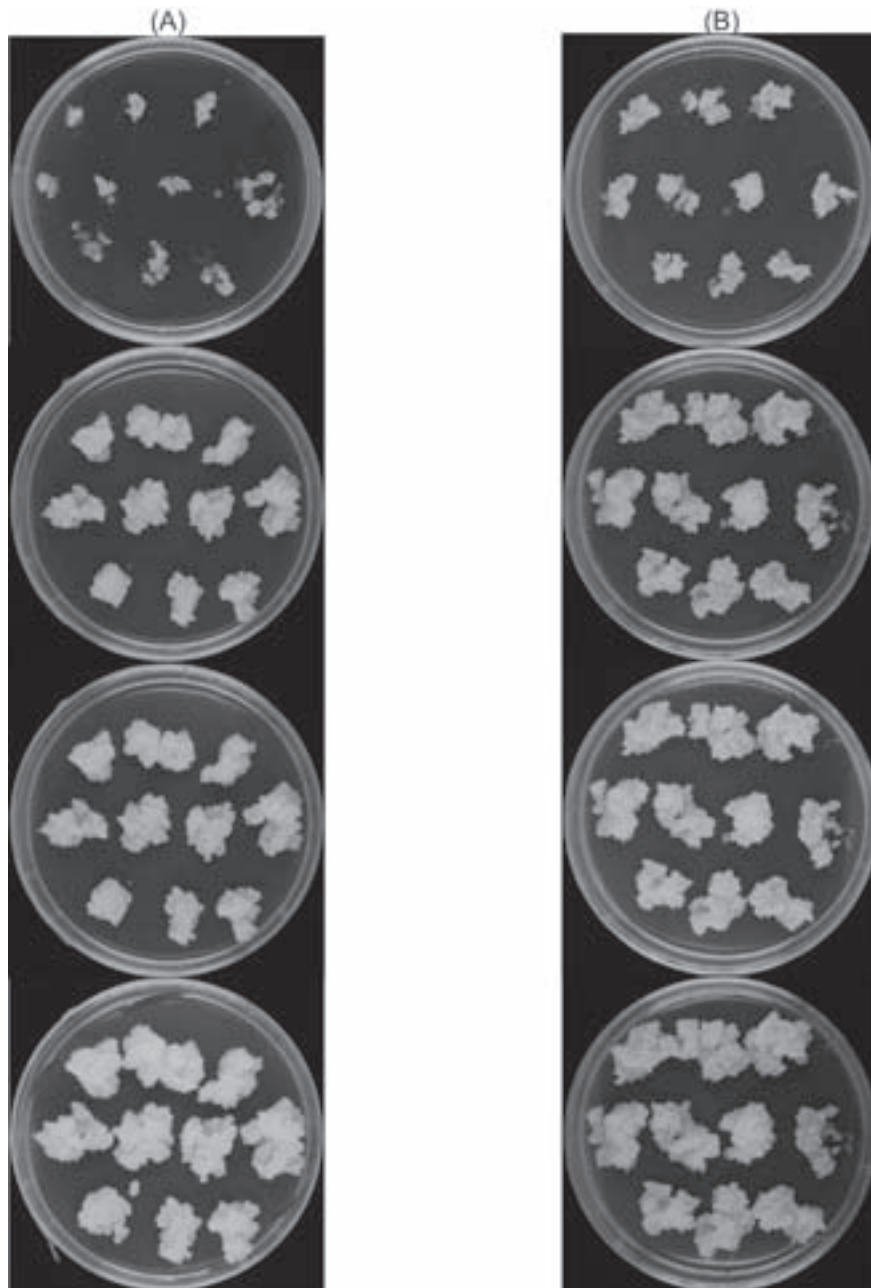


圖 3. 台灣黃蘗癒合組織第 0 至 30 天生長情形。左側為初始鮮重 0.5 g (A)，右側為初始鮮重 1.0 g (B)，由上至下分別為生長第 0、14、18 及 30 天。

Fig. 3. Calli of *Phellodendron amurense* Rupr. var. *wilsonii* cultured on MS medium with 1.0 mg/L BA 及 0.5 mg/L 2,4-D for 0 to 30 days. From top plates to bottom plates: 0-, 14-, 18-, and 30-day-old cultures, respectively. Cultures in left column (A) were from calli with initial fresh weight of 0.5 g/callus; and cultures in right column (B) were from calli with initial fresh weight of 1.0 g/callus.

合組織生長曲線圖(圖 4)，結果顯示以 0.5 g 之癒合組織為最初之生長量，其生長對數期為第 12 天 (2.28 g) 至第 14 天 (6.63 g)，第 18 天達最大量 7.38 g，第 20 天細胞量減少並停止生長，其最佳繼代時間為第 14–16 天；以 1.0 g 之癒合組織為最初之生長量，其生長對數期為第 12 天 (3.62 g) 至第 14 天 (7.15 g)，第 18 天達最大量 7.92 g，第 20 天至第 30 天細胞體積雖有增加但其重量卻減少，且繼代培養後細胞嚴重褐化。因此，以 0.5 g 初始接種量癒合組織之增殖率較高。

台灣黃蘗細胞懸浮培養之建立

將葉柄誘導之癒合組織 0.5 g 切碎，置於含 20 mL 添加 1.0 mg/L BA 及 0.5 mg/L 2,4-D 之 WPM 液體培養基之 125 mL 三角瓶內，進行震盪培養，細胞生長情形如圖 5；以沈降體積 (PCV) 為指標進行懸浮細胞生長調查，細胞生長曲線如圖 6，結果顯示懸浮細胞在第 10–15 天為生長對數期，第 30 天達最大量

16.29 mL，而後停止生長，因此，最佳之繼代時間為第 16–18 天。

確認最佳繼代天數後，取台灣黃蘗懸浮細胞鮮重各 10、30、50 g 置於內含 200 mL 液體培養基 (40 mL 原液與新鮮 160 mL 培養液) 之 1000 mL 三角錐形瓶培養，並於第 14 天時進行生長倍數調查，結果顯示如表 1，以 10 g 懸浮細胞培養於 200 mL 液體培養基中增殖倍率最佳，細胞量可成長 3 倍以上；三個處理在第 14 天時之細胞量為 32–62 g，顯示 200 mL 液體培養基足可供應 62 g 以上細胞生長，在第 30 天觀察時甚至長滿懸浮細胞，並且無褐化情形。

小蘗鹼萃取、分析方法與檢量線製作

小蘗鹼標準品之 HPLC 分析：經測試不同移動相，確認以移動相 H₂O 500 mL/Acetonitrile 500 mL/KH₂PO₄ 3.4 g/SDS 1.7 g 最佳，流速 1.0 mL/min，管柱溫度 30°C，偵測波長為 343 nm，以小蘗鹼標準品及市售黃蘗藥材萃取

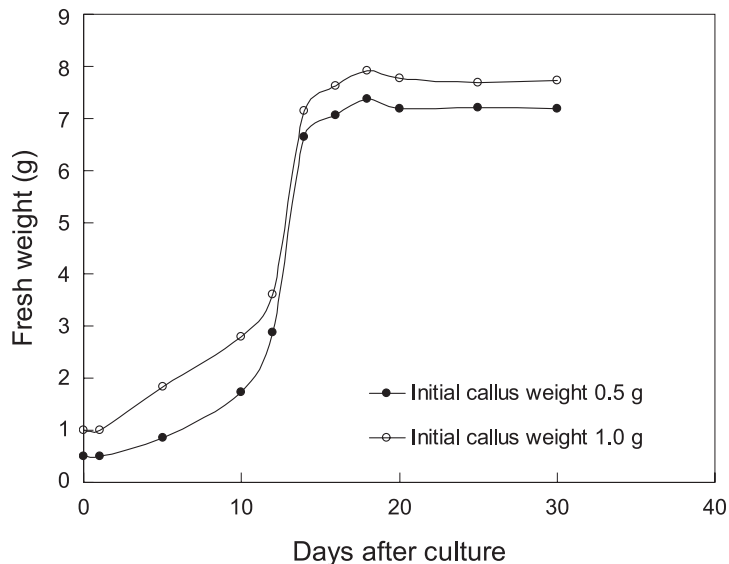


圖 4. 台灣黃蘗癒合組織生長曲線圖 (標準差介於 0.008–0.021 之間，無法在圖上顯示)。

Fig. 4. Callus cultures of *Phellodendron amurense* Rupr. var. *wilsonii* growing from different initial callus weight (0.5 g/callus and 1.0 g/callus) for 0, 10, 20, 30 and 40 days. Standard deviation was 0.008–0.021.

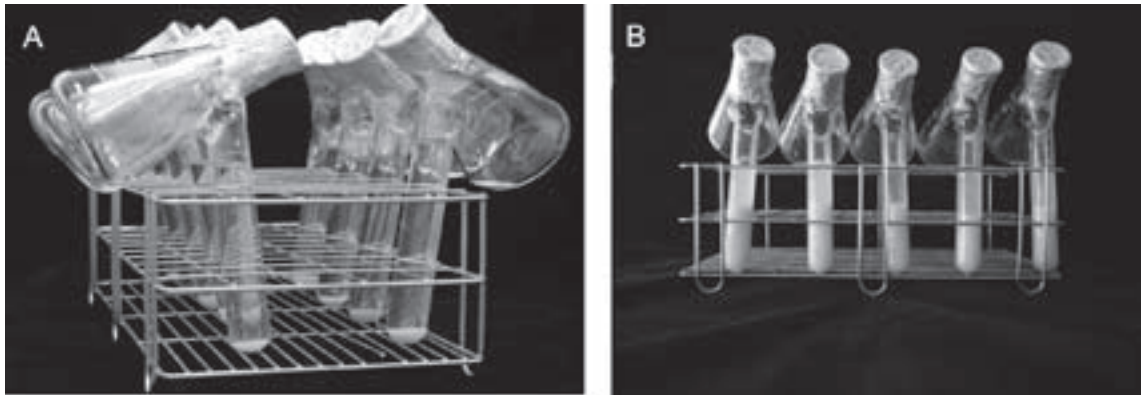


圖 5. 台灣黃蘗懸浮細胞培養生長調查。(A) 以 PCV 1.5 mL 之懸浮細胞為初始細胞量；(B) 為懸浮細胞第 12 天之生長調查。

Fig. 5. Cell proliferation of *Phellodendron amurense* Rupr. var. *wilsonii* in suspension cultures in PCV for 0 day (A) and 12 days (B). Initial volume of cell suspension (0 day) was 1.5 mL in PCV.

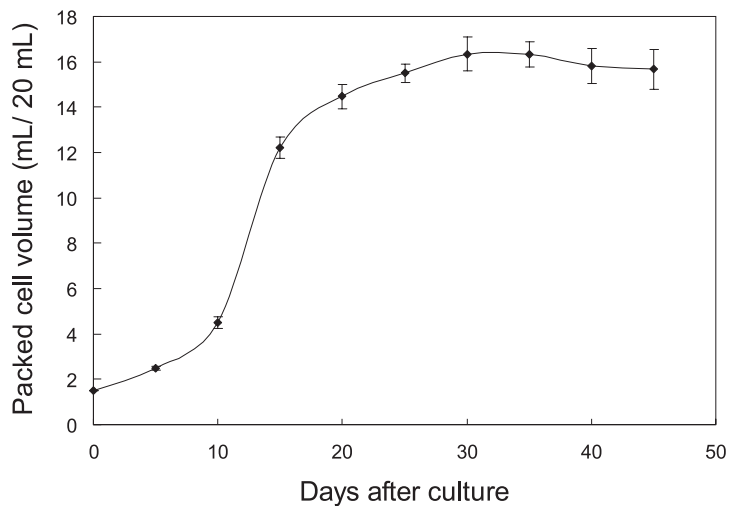


圖 6. 台灣黃蘗細胞懸浮培養生長曲線圖。圖上垂直誤差線為標準差 ($n = 3$)。

Fig. 6. Growth curve of cell suspension cultures of *Phellodendron amurense* Rupr. var. *wilsonii*. Vertical error bars indicate standard deviation ($n = 3$).

表 1. 不同初始懸浮細胞量對第 14 天後生長倍數的影響

Table 1. Effect of initial amount of cells of *Phellodendron amurense* Rupr. var. *wilsonii* on amount of cells produced in 14-day-old suspension cultures

| Initial amount of cells (g) | Amount of cells in 14-day-old cultures (g) | Proliferation multiplication |
|-----------------------------|--|------------------------------|
| 10 | 32.8 ± 0.7 c ^z | 3.28 |
| 30 | 51.0 ± 3.4 b | 1.70 |
| 50 | 61.7 ± 0.8 a | 1.23 |

^z Values are mean ± standard error ($n = 6$). Means within column followed by different letters are significantly different at 5% level by LSD test.

物所得 HPLC 分析圖譜如圖 7，小蘗鹼定性分析之波峰位置約在 13.5 分鐘。以不同濃度小蘗鹼標準溶液進行檢量線製作，標準曲線之結果如圖 8， R^2 可達 0.999 以上，表示此分析方法穩定性高，但進行每一批次樣品之 HPLC 分析時，皆會以 10、20、30、40 及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之小蘗鹼標準溶液重新製作檢量線，以維持分析準確性。

不同溶劑之小蘗鹼萃取效益評估：以市售黃蘗藥材為材料，分別以 99.5% 甲醇、95% 乙醇、75% 乙醇及水共 4 種溶劑進行小蘗鹼萃取，經萃取及 HPLC 分析得知，小蘗鹼含量依序為 1.32%、0.5%、3.21% 及 2.32%，經統計分析在 4 種溶劑處理之間均達顯著差異 ($P < 0.05$)，表示以 75% 乙醇進行 3 次萃取，可萃得最高含量小蘗鹼，後續試驗也都以 75% 乙

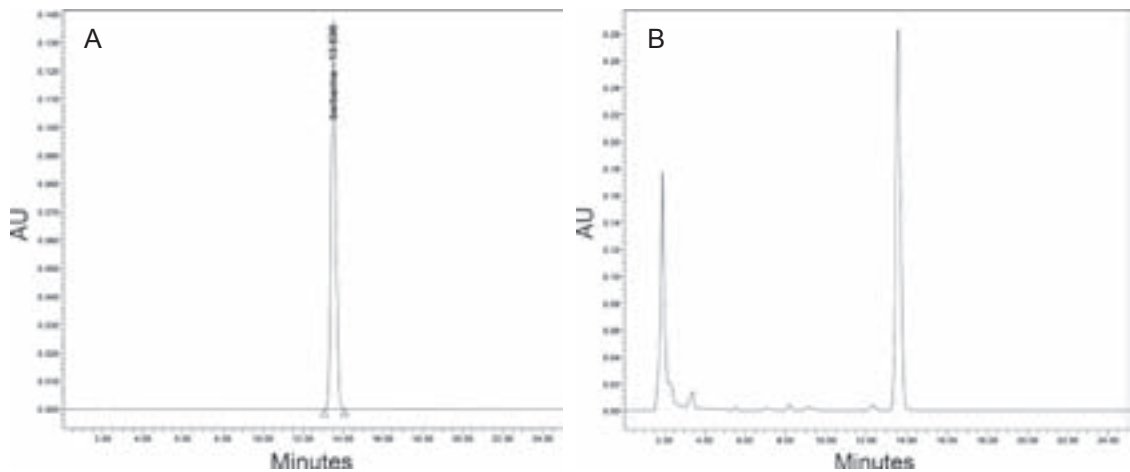


圖 7. 小蘗鹼標準品 50 ppm (A) 及市售黃蘗藥材 (B) 萃取物之 HPLC 圖譜。

Fig. 7. The HPLC chromatograms showing the peak of berberine from 50 ppm standard sample (A) and the peak from extracts of *Phellodendron wislonii* bark slices from a commercial market (B).

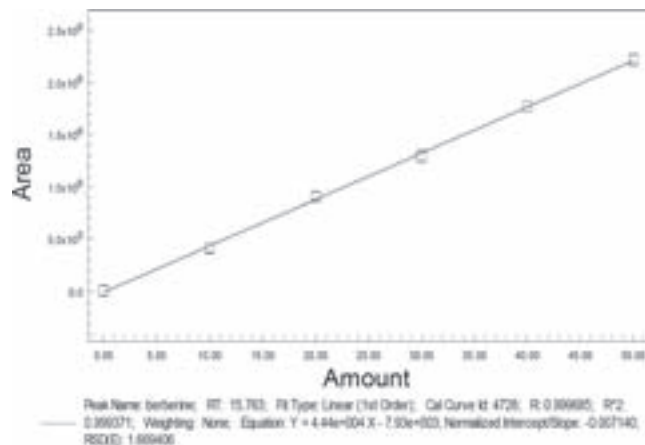


圖 8. 小蘗鹼 HPLC 分析之檢量線。

Fig. 8. The HPLC standard calibration curve of berberine.

醇為萃取溶劑。

植物生長調節劑處理以提高懸浮細胞小蘗鹼含量

取台灣黃蘗之癒合組織進行萃取及成份分析，結果顯示癒合組織中並無小蘗鹼含量，又癒合組織需以固態培養基培養，生長調節劑處理不方便，因而後續試驗皆以懸浮細胞為材料，進行不同處理以提高小蘗鹼含量。以 WPM 培養基進行台灣黃蘗懸浮細胞培養，於第 18 天外加不同植物生長調節劑處理，細胞生長及增殖情形良好，外觀及生長量無明顯差別，第 28 天時取懸浮細胞經萃取及 HPLC 分析圖譜如圖 9，由圖中可以看到小蘗鹼被誘導產生，比較不同生長調節劑處理誘導結果，4 種處理分別為 (1) 添加 6 mg/L NAA 及 2 mg/L BA；(2) 添加 6 mg/L IBA 及 2 mg/L BA，(3) 未添加 NAA、IBA、BA 之正常懸浮細胞；

(4) 未添加 NAA、IBA、BA 之已褐化懸浮細胞，小蘗鹼分析含量依序為 188.68、59.74、69.19 及 13.59 $\mu\text{g/g dw}$ ，經統計分析在 4 種處理之間均達顯著差異 ($P < 0.05$)，以添加 2 mg/L BA 及 6 mg/L NAA 處理之小蘗鹼含量最高，但 4 種處理培養後之培養基中都未測得小蘗鹼含量，顯示在此培養期間，懸浮細胞合成的小蘗鹼並不會釋放到培養基中。

討 論

台灣黃蘗為優異的黃蘗藥材來源，從栽培至可供藥材使用需費時 6–8 年，因市場需求而過度採集，野外已甚為少見，屬於保育類木本植物，但台灣黃蘗近年來遭非法砍伐或剝皮層時有所聞，實有加速復育之必要；另一方面，藥用植物之活性成分往往隨產地不同有所差異，依台灣黃蘗之地理海拔分佈不同，其樹皮

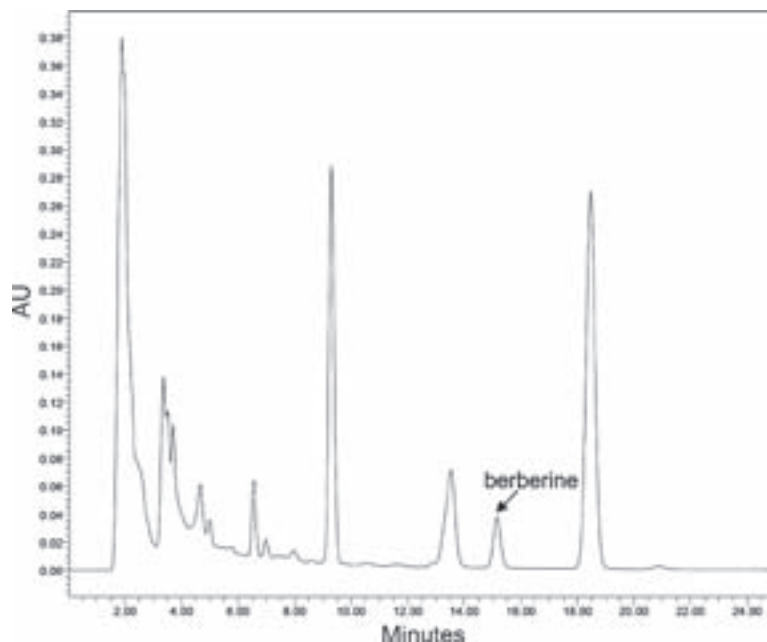


圖 9. 台灣黃蘗懸浮細胞萃取物之 HPLC 圖譜。

Fig. 9. The HPLC chromatogram showing berberine (arrow) in the extract of cell suspension cultures of *Phellodendron amurense* Rupr. var. *wilsonii*.

之小蘗鹼含量也不同 (2.1% 到 3.1% 不等), 可能與種原變異有關。本研究以發芽二個月內之新生植株莖段為培植體, 可順利獲得生長良好之無菌組培苗, 可作為癒合組織誘導之材料來源, 另一方面, 日後若篩選高小蘗鹼含量單株作為材料來源, 可以此基礎進行組織培養苗大量繁殖, 作為復育栽培之優良種苗來源, 相似模式在利用紅豆杉生產紫杉醇已有成功先例。

藉由台灣黃蘗懸浮細胞培養來生產小蘗鹼, 是進行野外植株復育外的另一選擇, 可在細胞培養條件下穩定的生產小蘗鹼, 誘導篩選高品質之癒合組織, 並建立台灣黃蘗懸浮細胞培養系統是重要基礎。本研究以種子發芽生長 2 個月後之新生植株的葉片作為培植體, 分別以葉片、中肋及葉柄進行癒合組織誘導, 都有不錯的效果, 顯示幼嫩的葉片是癒合組織誘導的適當材料, Koul *et al.* (1983) 也曾指出 *Bupleurum falcatum* 近頂芽尖端之嫩芽, 誘導癒合組織能力可達 100%, 隨著葉片年齡增加, 誘導率驟降, 老葉幾乎喪失癒合組織誘導力。在台灣黃蘗葉片三個部位中, 又以葉柄部位誘導效果最佳, 癒合組織外觀顏色較佳且組織柔軟, 如此結果與 Tai (1996) 研究結果大致相同, 但本研究發現在誘導癒合組織中添加 2 mg/L 2,4-D, 則癒合組織全部褐化, 降低濃度至 0.5 mg/L 2,4-D 則誘導結果良好, 繼代培養也獲得同樣結果, 以 WPM 固態培養基及加入其他有機成分, 繼代培養之癒合組織質地鬆軟, 顏色淡黃且鬆散, 生長旺盛無褐化現象, 推究其原因可能是培植體來源及部位不同, 本研究使用台灣黃蘗幼株嫩葉, 而 Tai (1996) 取用成株嫩葉進行誘導, 導致 2,4-D 最適用量不同。

相對於一般木本植物之癒合組織及細胞生長緩慢且容易褐化, 本研究獲得之台灣黃蘗的細胞癒合組織, 繼代培養後生長期可至少維持 30 天不褐化, 以最初細胞量 0.5 g, 生長

至第 18 天約成長 8 倍之多, 且質地鬆軟、顏色淡黃, 適合作為細胞懸浮培養材料, 移至 WPM 液體培養基可順利進行懸浮細胞培養, 其細胞生長量於第 20 天後約成長 9 倍之多, 並持續生長至少 30 天, 且細胞顏色淡黃能持續生長旺盛及無褐化現象。

取台灣黃蘗癒合組織及未經處理誘導之懸浮細胞進行 HPLC 分析, 二者皆含微量小蘗鹼成分, 而 Yamamoto *et al.* (1987) 曾指出東亞唐松草 (*T. minus*) 之癒合組織或細胞懸浮培養, 其小蘗鹼含量與原母株之小蘗鹼含量多寡無絕對關係, 建議可篩選生長旺盛且無褐化之細胞系增加生物產量, 再藉由逆境處理或使用添加物, 達到促進小蘗鹼合成之目的, 而 Hara *et al.* (1994) 進行東亞唐松草細胞懸浮培養時, 添加 BA 能活化 norcochlorogenic-O-methyltransferase (NCMT), 進而能使小蘗鹼產量增加, 因此, 本研究之台灣黃蘗懸浮細胞培養採用二階段方式, 在懸浮細胞生長初期, 使懸浮細胞增殖, 在懸浮細胞增殖 18 天後, 以不同生長調節劑進行誘導處理, 結果發現同時加入 2 mg/L BA 及 6 mg/L NAA 處理組合, 誘導出之小蘗鹼含量最高, 並且將培養天數持續至 28 天以上, 同時細胞生長量可增加為初始之 10 倍。

關於台灣黃蘗成分萃取及分析方面, 本研究發現同一材料以 75% 乙醇為萃取溶劑可萃得較高量小蘗鹼, 此法方便快捷且有效, 相較於其他萃取溶劑 (如氯仿等) 無致癌性及副作用之虞, 且於後續活性成分純化、藥理實驗 (動物、人體等) 更為便利安全。在 HPLC 分析方面, 許多植物含有小蘗鹼成分, 但其中亦含其他數種不同之化合物, 因此, 不同植物之萃取物如以同一波長或移動向為相同分析條件, 極可能會發生干擾情形, 以狹葉十大功勞為例, 其小蘗鹼最適檢測波長為 260 nm, 但本實驗分析台灣黃蘗懸浮細胞之小蘗鹼含量以波

長 343 nm 最佳。

整體而言，本研究以台灣黃蘗幼株進行癒合誘導，並能順利建立懸浮細胞培養系統，在懸浮細胞培養後期添加 BA 及 NAA 可誘導小蘗鹼生合成，可作為日後以台灣黃蘗細胞進行小蘗鹼大量生產之基礎，再者，懸浮細胞若以不同之生長調節劑處理，也可能誘導出棕櫚鹼及黃蘗鹼等其他藥用成分。比較市售黃蘗藥材與台灣黃蘗懸浮細胞之 HPLC 圖譜 (圖 7 及圖 9)，發現二者圖譜差異甚大，黃蘗藥材以小蘗鹼為主，其餘成分在 343 nm 波長下並無呈現，而懸浮細胞在 9.5、13.5 及 18.5 分鐘另有其他成分生合成，其中一個成分已確認為棕櫚鹼 (Palmatine)，如此結果說明台灣黃蘗懸浮細胞培養具有生產藥用成分潛力。

引用文獻 (Literature cited)

- AboEl-Nil, M. M. 1997. Tissue culture of native plants in the developing countries. *Acta Hort.* 447:507-513.
- Chiu, N. Y. and K. H. Chang. 1999. The Illustrated Medicinal Plants of Taiwan. SMC Publishing Inc. Taipei. 283 pp. (in Chinese)
- Hara, M., S. Tanaka, and M. Tabata. 1994. Induction of a specific methyltransferase activity regulating berberine biosynthesis by cytokinin in *Thalictrum minus* cultured cells. *Phytochemistry* 36:327-332.
- Ho, C. K., S. H. Chang, and K. H. Chen. 2005. Production of secondary metabolites via bioreactor. *Agriic. Biotechnol. Ind. Quarterly* 1:23-25. (in Chinese)
- Iwasa, K., H. Nanba, D. U. Lee, and S. I. Kang. 1998. Structure-activity relationships of protoberberines having antimicrobial activity. *Planta Med.* 64:748-751.
- Kan, W. S. 1986. *Pharmaceutical Botany*. National Research Institute of Chinese Medicine. Taipei. 699 pp. (in Chinese)
- Koul, S., A. Ahuja., and S. Grewal. 1983. Growth and alkaloid production in suspension cultures of *Hyoscyamus muticus* as influenced by various cultural parameters. *Planta Med.* 47:11-16.
- Liao, C. T. 2000. *Introduction to Medicinal Plants*. China Medical University. Taichung. 414 pp. (in Chinese)
- Nakagawa, K., A. Konagai, H. Fukui, and M. Tabata. 1984. Release and crystallization of berberine in the liquid medium of *Thalictrum minus* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 3:254-257.
- Nakagawa, K., H. Fukui, and M. Tabata. 1986. Hormonal regulation of berberine production in cell suspension cultures of *Thalictrum minus*. *Plant Cell Rep.* 5:69-71.
- Su, Y. J., R. S. Yang, and C. Y. Kao. 1990. Secondary metabolite production through tissue culture. *Bio-industry* 1:1-14. (in Chinese)
- Tai, S. S. 1996. *Tissue Culture of Phellodendron wilsonii* HAY. et KANEHIRA. Master Thesis. School of Chinese Medicine, China Medical University. Taichung. 103 pp. (in Chinese with English abstract)
- Tsay, H. S. 1984. The studies on plant tissue culture techniques and their application in TARI. *Sci. Agric.* 32:205-210. (in Chinese)
- Tu, C. C., H. S. Lu, and S. Y. Liu. 1995. *Proceeding of a Symposium on Development and Utilization of Resources of Medicinal Plants in Taiwan (Special Publication of TARI No. 48)*. Taiwan Agricultural Research Institute. Taichung. 346 pp. (in Chinese)
- Tzeng, S. Y. 2006. *Studies on the Tissue Culture and Berberine Content of Mahonia fortunei Fedde*. Master Thesis. Graduate Institute of Agriculture, National Chiayi University, Chiayi. 100 pp. (in Chinese with English abstract)
- Yamamoto, H., M. Suzuki, Y. Suga, H. Fukui, and M. Tabata. 1987. Participation of an active transport system in berberine-secreting cultured cells of *Thalictrum minus*. *Plant Cell Rep.* 6:356-359.

Berberine Production in Cell Suspension Cultures of *Phellodendron amurense* Rupr. var. *wilsonii* (Hayata & Kanehira)¹

Chi-Han Liu², Jui-Sheng Lai³, Horng-Mo Lee⁴, and Min-Tze Wu^{3,5}

Abstract

Liu, C. H., J. S. Lai, H. M. Lee, and M. T. Wu. 2012. Berberine production in cell suspension cultures of *Phellodendron amurense* Rupr. var. *wilsonii* (Hayata & Kanehira). *J. Taiwan Agric. Res.* 61:196–208.

Barks of Huang-Po (*Phellodendron* spp.) contain berberine and it is used as an important herbal medicine for the treatment of fever, inflammation, stomach ache and intestinal illness. Taiwan Huang-Po [*Phellodendron amurense* Rupr. var. *wilsonii* (Hayata & Kanehira)] is a native species in Taiwan and the bark of this plant is used as an important medicine because of its high berberine content. However, it would take more than 6–8 years to grow Taiwan Huang-Po trees for harvesting barks. In addition, the supply of barks of Taiwan Huang-Po from natural habitat is dwindling due to excessive harvesting of this plant. The objective of this study was to establish a cell suspension culture method for production of berberine from Taiwan Huang-Po, as an alternative method for production of berberine from barks of plants grown in natural habitat. Two months old seedlings were used as explants to induce callus in this study. Leaf petiole was proven to be the best tissue for callus induction. Leaf petioles were placed on Murashige and Skoog (MS) basal medium containing 0.5 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 1.0 mg/L 6-benzylaminopurine (BA) and incubated in dark for 28 days to form callus tissues which were used as inoculum for cell suspension cultures. Callus tissues were inoculated on a medium containing WPM basal salt amended with 0.5mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L BA and the cell suspension was cultured on a shaker at 100 rpm for 20 days and then used for testing amount of cells and berberine in the cultures. Results showed that the total amount of cells in the cell suspension cultures increased by 9 folds after incubation for 20 days but no berberine was detected when the cells were extracted by 75% ethanol and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). In contrast, suspension cells grown in the medium containing 2 mg/L BA and 6 mg/L α -naphthaleneacetic acid (NAA) for 18 days, resulted in production of berberine. Berberine accumulation reached 188.68 μ g/g dry weight in the 28-day-old, cell-suspension culture. Thus, this method of employing growth regulators in cell suspension culture may be important in establishing protocol for industrial production of berberine from cell suspension cultures of the endemic species *P. amurens*.

Key words: *Phellodendron amurense* var. *wilsonii*, Callus, Cell suspension, Berberine, High performance liquid chromatograph (HPLC).

1. Contribution No. 2671 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: June 5, 2012.
2. Graduate student, Institute of Pharmaceutical Science, Central Taiwan University of Sciences and Technology, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Respectively, Assistant Researcher, Researcher and Head, Biotechnology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
4. President, Central Taiwan University of Sciences and Technology, Taichung, Taiwan, ROC.
5. Corresponding author, e-mail: wu@tari.gov.tw; Fax: (04)23302806.