

# 银杏悬浮培养细胞的生长、分化与萜内酯化合物的积累

莫小路 黄学林\*

(中山大学生命科学学院, 教育部基因工程重点实验室, 广州 510275)

**摘 要** 研究了来源于银杏种子胚和幼苗茎的悬浮细胞的生长、分化和培养物中的白果内酯、银杏内酯 A 和 B 的含量变化。结果表明:在悬浮培养中,细胞聚集而成的细胞团大小、细胞中叶绿体的分化、外植体来源都影响培养物中的萜内酯的种类和含量,胚来源的悬浮细胞培养物中,银杏内酯 B 仅存在于直径  $< 2\text{mm}$  的小细胞团悬浮培养中,且在  $< 1\text{mm}$  的细胞团中的含量最高,达  $0.437\text{ mg/g DW}$ ,而直径  $> 3\text{mm}$  的细胞团悬浮培养物中只含有白果内酯和银杏内酯 A。相同大小的悬浮细胞团中,胚来源的细胞中萜内酯含量高于茎来源的细胞。

**关键词** 银杏, 银杏内酯, 细胞分化, 细胞悬浮培养

中图分类号 Q942.6 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0445-05

银杏(*Ginkgo biloba* L.)是重要的药源植物,其药用成分包括黄酮类、萜内酯、聚戊烯醇类和多糖等,其中,银杏内酯(Ginkgolide,简称 GK)作为血小板活化因子(PAF)的拮抗剂被广泛应用于心脏病、休克、炎症和老年性痴呆等疾病的治疗<sup>[1]</sup>。银杏内酯主要存在银杏叶片和根皮中,含量极低,且不同树龄、不同采收时间的差别很大<sup>[2]</sup>,目前药品市场上的银杏内酯均来源于银杏叶片,通过愈伤组织和细胞悬浮培养获得银杏内酯是很有前景的新途径,国内外在这方面已有较多的研究<sup>[3-6]</sup>,尽管没有分化的银杏细胞培养很容易在生物反应器中扩大,但由于培养物中的萜内酯的含量很低,这一技术尚未进入银杏内酯的工业化生产。细胞的分化是影响次生代谢物合成的重要因素之一<sup>[7]</sup>,而有关银杏细胞悬浮培养物中的细胞分化与萜内酯积累的详细研究少有报道。

考虑到以种子为外植体可以不受季节和原料产地等因素的限制,我们用银杏的种子胚及其萌发 30d 的银杏幼苗茎段为外植体诱导愈伤组织,建立的细胞悬浮体系为材料,用 HPLC 法定量检测培养物中的白果内酯和银杏内酯 A、B 含量,研究细胞的生长、分化与银杏萜内酯化合物积累的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

银杏种子产自江苏盐城地区,银杏内酯 B 标准品购自美国 Sigma 公司,银杏内酯 A 和白果内酯标准品购自中国药品和生物制品检定所。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 愈伤组织诱导和细胞悬浮培养的方法见文献[8],胚

来源的细胞悬浮培养基为 MS,附加  $3.0\text{ mg/L}$  NAA,  $2.0\text{ mg/L}$  KT, 3% 的蔗糖;茎来源的悬浮培养基为 N6,附加  $3.0\text{ mg/L}$  2,4-D,  $1.0\text{ mg/L}$  NAA,  $1.0\text{ mg/L}$  BA, 3% 的蔗糖。培养条件为  $25^\circ\text{C}$ , 16 h 光照/8h 黑暗培养,光照强度  $40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,摇床转速为  $100\text{ r/min}$ 。悬浮细胞每 18d 继代 1 次。

**1.2.2 细胞生长量测定方法**见文献[8],生长指数(growth index)=(收获的细胞鲜重-接种的细胞鲜重)/接种的细胞鲜重。

**1.2.3 细胞分化程度的检查**按文献[9]方法测定细胞中的叶绿素含量,在显微镜下观察细胞内叶绿体的数量;按文献[10]方法做石蜡切片,观察细胞团内部结构:细胞的类型、排列方式。

**1.2.4 培养物中萜内酯的提取分离、定量检测**参照文献[11,12]方法。

色谱柱:Diamonsil<sup>TM</sup>(钻石) $\text{C}_{18}$ 柱( $250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$ ,  $5\mu\text{m}$ ),DAD 检测器,分析时柱温为室温( $28^\circ\text{C}$ ),流动相:甲醇:水 = 40:60(V/V),流速  $0.8\text{ mL/min}$ ,检测波长  $220\text{ nm}$ ,灵敏度为 0.02,进样量:  $10\mu\text{L}$ ,以外标法计算样品中的银杏内酯和白果内酯含量。

## 2 结果和分析

### 2.1 接种量对悬浮细胞生长的影响

在接种量  $20\text{ g/L}$  到  $80\text{ g/L}$  FW 范围内,接种量越大,细胞达到最大生长量所需的时间越短,但细胞的鲜重生长指数降低,为了在较短的周期内获得较大的细胞增长量,选择  $40\text{ g/L}$  FW 的接种量最适(表 1)。

表 1 接种量对悬浮细胞生长的影响				
Table 1 The effect of inoculation on the growth of suspension cell				
Cell weight/(g/L)FW	20	40	60	80
Culture time of highest biomass/d	24	21	15	12
Growth index	7.2	5.1	3.4	1.2

2.2 悬浮细胞的生长曲线

由图 1、2 可见,胚来源和茎来源的悬浮细胞的生长曲线相似,都在 21d 左右达到最大生长量。据文献[4,5]报道,银杏悬浮细胞中,银杏内酯含量在培养到 13~14d 时达到最大,而此时细胞的生物量较小,结合细胞的生长动态,本研究将培养细胞的收获时间定为 18d。

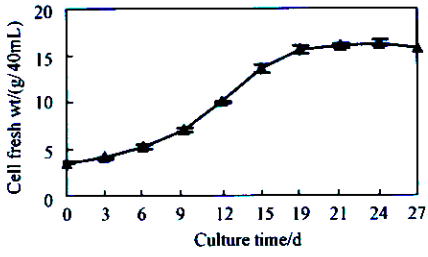


图 1 胚来源的悬浮细胞的生长曲线

Fig.1 The time-course of growth in cell suspension culture from embryo

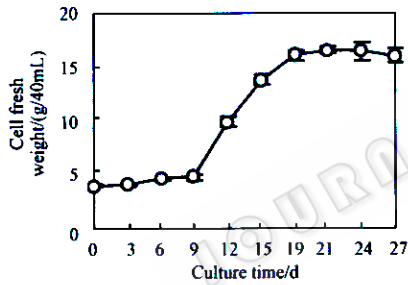


图 2 茎来源的悬浮细胞的生长曲线

Fig.2 The time-course of growth in cell suspension culture from stem

表 2 胚来源的悬浮细胞中叶绿素含量对细胞中萜内酯化合物积累的影响			
Table 2 The effect of chl. Cont. on the terpene lactone accumulation in embryo derived suspension cell			
Light level/( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Dark	24	40
Color of suspension culture	Yellow	Yellowish green	green
Chl. (a + b)/( $\mu\text{g/g}$ )FW*	10.71 $\pm$ 0.113	17.12 $\pm$ 0.715	21.02 $\pm$ 0.541
Growth index*	4.7 $\pm$ 0.412	4.3 $\pm$ 0.628	4.2 $\pm$ 0.235
Bilobalide/(mg/g)DW	0.096	0.118	0.521
Ginkgolide A/(mg/g)DW	0.294	0.100	0.358
Ginkgolide B/(mg/g)DW	- * *	0.316	0.518

\* each value is the mean  $\pm$  SD of 3~5 separated experiments.  
\* \* “-” means cannot be determined

表 3 继代培养次数对细胞团大小的影响					
Table 3 The effect of subculture frequency on the size of cell aggregates subculture frequency					
Number of subculture	3	4	6	8	10
Size of cell aggregates/mm	< 0.5	0.5~1.0	1.0~1.5	1.5~2.5	2.5~3.5

2.5 悬浮细胞团的大小对萜内酯化合物积累的影响

图 6 可看出,不同大小的悬浮细胞中的萜内酯化合物的

2.3 光照对叶绿体分化和萜内酯化合物积累的影响

在银杏细胞悬浮培养中,光照能促进细胞中叶绿体的生成,在强光( $40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )下培养的细胞颜色较绿,在显微镜下观察,这些细胞中叶绿体的数量较多(图 3、4)。对不同光照条件下培养的悬浮细胞中的叶绿素和萜内酯化合物的测定结果显示:悬浮细胞中的叶绿体分化水平影响细胞中的萜内酯化合物的积累(表 2)。

2.4 细胞的聚集对细胞生长的影响

在细胞悬浮培养中,很容易发生细胞的聚集,形成细胞团(cell aggregates),尤其是胚来源的悬浮细胞,随着继代次数增多,细胞团逐渐变大(表 3),不同大小的细胞团的生长指数见图 5,颗粒较大的细胞团生长较慢,小于 0.5mm 的细胞团生长最快。

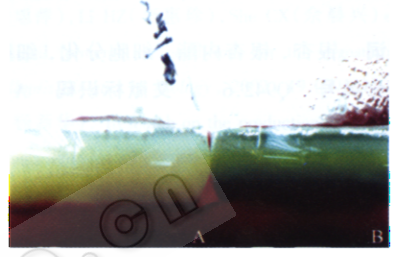


图 3 悬浮细胞培养物的颜色差异

Fig.3 Cell suspension cultures in chloroplasts inside cell

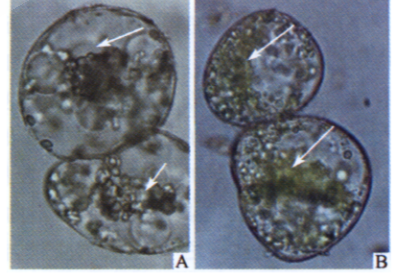


图 4 图 3 中的细胞显微结构,箭头示叶绿体(400 $\times$ )

Fig.4 Enlarged(400 $\times$ ) cells of Fig.3, the arrow show different color

种类和含量都有差异,银杏内酯 B(Ginkgolide B,简称 GKB)只在直径<2mm 的小细胞团中积累,且在<1 mm 的细胞团

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

中的含量最高可达到 0.437 mg/g DW;而 > 3mm 的细胞团中只有白果内酯(Bilobalide,简称 BB)和银杏内酯 A(Ginkgolide

A,简称 GKA)。细胞团的大小超过 3 mm 后,其中的 GKA 含量不再增加,而白果内酯的含量随着细胞团的增大而提高。

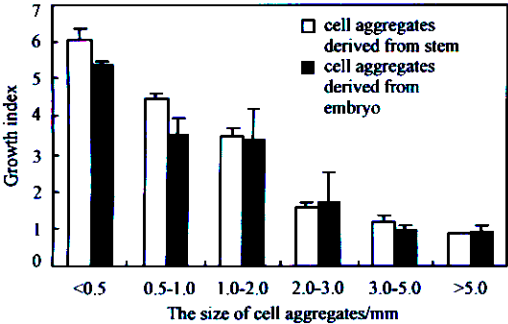


图 5 培养 18d 后,悬浮细胞团的大小对生长指数的影响  
Fig.5 The effect of cell aggregates size on the growth index of suspension cell cultured 18d

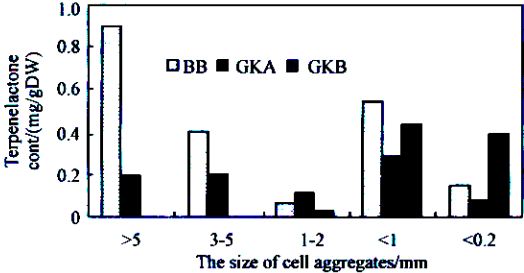


图 6 胚来源的悬浮细胞团的大小对其中的萜内酯化合物积累的影响  
Fig.6 The effect of aggregates size on terpene lactone accumulation in embryo derived suspension cell

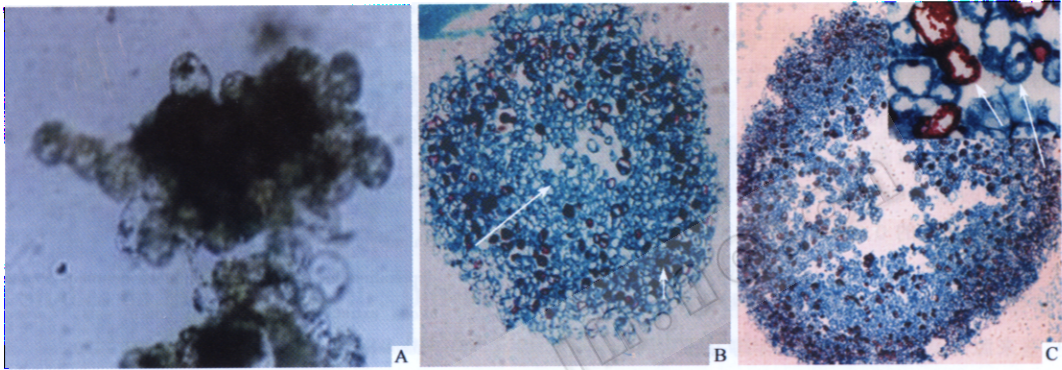


图 7 A 直径约为 0.2 mm 的胚来源的小细胞团 (100×);B 直径约为 1.5mm(25×);C 直径约为 3.5mm 的胚来源的细胞团石蜡切片(10×),长箭头示薄壁细胞,短箭头示衰老或木质化细胞

Fig. 7 A:Suspension cell aggregates derived from embryo with size near 0.2mm;B: Histological section of cell aggregates with size about 1.5mm(stained with safranin O-fast green,25×),long arrow show parenchyma cells,short arrow show senile or lignified cells; C: Histological section of cell aggregates with size about 3mm(stained with safranin O-fast green,10×);top right corner is the enlarged cell

不同大小的细胞团内部细胞的组成、分布各不相同。小细胞团中的细胞排列紧密,粒径 < 0.5mm 的悬浮细胞团(图 7A)中,组成细胞团的细胞均为薄壁细胞,未见形态上的分化;而粒径 > 1mm 的细胞团内部在大量的薄壁细胞中夹杂了一些衰老或木质化的细胞,有的细胞内部可见内含物(图 7B、C)。随着细胞团的增大,细胞团内部细胞间隙加大,细胞逐渐变得松散。在粒径 > 3mm 的细胞团的中央为空腔。细胞团越大,其中的衰老或木质化的细胞所占的比例越大,而薄壁细胞相对减少。

### 2.6 外植体的来源对悬浮细胞中萜内酯化合物含量的影响

比较在胚来源的和茎来源的两个培养体系中相同大小的细胞团中的萜内酯化合物,在 < 1mm 的细胞团中,胚来源的细胞团中的白果内酯、银杏内酯 A 和 B 分别比茎来源的高 2 倍、1.4 倍和 0.56 倍;在 3 ~ 5mm 的细胞团中,胚来源的和茎来源的细胞团中均未检测到银杏内酯 B,胚来源的细胞团中有银杏内酯 A 和白果内酯,而茎来源的细胞团中只有白果内酯,且含量为胚来源的一半(图 8)。由此可见,外植体来源对细胞中的萜内酯化合物的种类和含量都有影响,对于银杏内酯的生产,胚来源的悬浮细胞培养体系优于茎来源的培养体系。

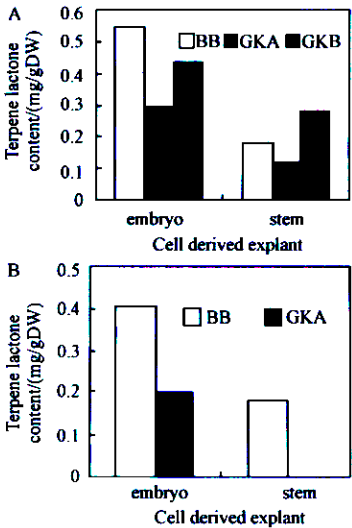


图 8 外植体来源对萜内酯的影响(A 图中细胞团粒径 < 1mm, B 图细胞团粒径为 3 ~ 5mm)

Fig.8 The effect of explant on the terpene lactone accumulation in cell aggregates < 1mm (A) and 3 ~ 5mm(B)

### 3 讨论

目前从银杏植物中分离提取的萜内酯有 6 种:二萜类化合物银杏内酯 A、B、C、M、J 和倍半萜化合物白果内酯,其中 GKA 和 GKB 对 PAF 的作用最强,尤其是 GKB,因此 EGB 中比较强调 A 和 B 的含量,特别是 B 的含量<sup>[13]</sup>;白果内酯对 PAF 拮抗较弱,但具有较强的神经保护作用<sup>[14]</sup>。因此,我们选定银杏内酯 A、B 和白果内酯为目的化合物,研究其在悬浮细胞中积累的规律。在所建立的胚来源和茎来源的悬浮细胞培养物中都检测到了这些化合物的存在,表明这两个体系的细胞都保留了母本植物的次生代谢能力。该悬浮细胞培养体系经过 18 个月的培养仍能保持生长,颜色为鲜绿色,未见衰退或褐化。

文献报道的银杏悬浮细胞的培养大多以根或叶为外植体,我们在前阶段的研究中发现,来源于银杏胚的悬浮细胞能产生较高的黄酮类化合物<sup>[15]</sup>,从而肯定了其合成次生代谢物的能力。Carrier 最先从银杏种子胚建立了细胞悬浮培养体系,但在培养物中只检测到了微量的银杏内酯 A<sup>[3]</sup>,本研究首次在胚来源的悬浮细胞培养物中检测到了银杏内酯 B 的存在,其含量达干重的 0.044%。在粒径 < 1mm 的细胞团中,胚来源的悬浮细胞中的 BB、GKA 和 GKB 的含量分别比茎来源的悬浮细胞高 2、1.4 和 0.56 倍;在粒径为 3~5mm 的细胞团中,茎来源的悬浮细胞团只含有约为胚来源的细胞团 1/2 量的 BB,而 GKA 和 GKB 均未检出。因此,在本文所研究的两个体系中,胚来源的更适于银杏萜内酯化合物的生产。

在前阶段的研究中,我们发现,细胞中的黄酮类化合物含量与细胞中的叶绿体分化有关<sup>[8]</sup>,在本研究中,银杏内酯也有类似的现象,即颜色较绿(叶绿体含量高)的细胞含有的银杏内酯也较高,这与王关林等<sup>[16]</sup>的研究经过一致。据 Flesch 的研究,银杏叶片中的萜内酯化合物含量与其接受的光照水平有关<sup>[17]</sup>,而在本研究中的银杏悬浮细胞在光照培养下生成大量叶绿体,但细胞中的叶绿体分化是否是萜内酯化合物合成的前提条件还需要进一步的研究。在细胞悬浮培养中,细胞生长到一定阶段会开始分裂,如果分裂后的细胞在培养过程中还未相互分离就进行了下一次的分裂,这样重复下去就形成了由多细胞聚集成的小细胞团( aggregates ),有研究表明这种细胞的聚集有助于次生代谢物的积累<sup>[18,19]</sup>。在本文所确定的培养条件下,培养细胞很容易聚集,尤其是胚来源的细胞,经数次继代培养即可获得一定大小的细胞团,对不同大小的胚来源的悬浮细胞培养物中的萜内酯含量的分析测定结果显示,较小的细胞团(< 2mm)能积累银杏内酯 B,并且在 < 1 mm 的悬浮细胞中的含量最高(0.437 mg/g DW),而大的细胞团(> 3mm)中只有银杏内酯 A 和白果内酯(图 4)。对这些细胞团的组织学研究结果显示,细胞团内部出现了不同程度的分化,这种分化水平对其中的萜内酯的种类和含量都有影响。由图 3 可看出,小的细胞团生长旺盛,即银杏内酯 B 主要在生长旺盛的细胞中积累,这与

Huh<sup>[20]</sup>和 carrier<sup>[21]</sup>的研究结果一致,Jeon<sup>[4]</sup>证明在叶来源的悬浮细胞中产生银杏内酯 B 的高峰是在培养后的第 13 天(细胞生长的对数期内),以后开始下降。

银杏内酯 A、B、C、M、J 的分子结构差异主要在于母环上的取代羟基数目。在植物中,主要以 GKA、GKB、GKC 三种形式存在,从 GKA 到 GKB、GKC 依次增多一个羟基。Cartayrade 用<sup>14</sup>C<sub>2</sub> 掺入白果内酯和银杏内酯的实验显示,在银杏植物中存在着 GKA 到 GKC 的自然生物转换,即氧化过程<sup>[22]</sup>。导致这一过程的原因还不清楚。在银杏悬浮培养细胞中,可能也存在这样的转换作用,在较小的细胞团中积累的 GKB,随着细胞团的生长、老化而被氧化成了多羟基的其他形式。因此,将培养细胞团的大小控制在 1mm 以下,有利于积累高效拮抗 PAF 的银杏内酯形式;另外,这种结构紧密的小细胞团能减轻因剪切力而发生的细胞自溶,适于在生物反应器中大规模培养,培养周期结束时,培养物易于固液分离。

致谢:银杏萜内酯的 HPLC 测定委托中山大学分析测试中心黄仲立老师完成,特此致谢。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Ahlemeyer B, Mowes A, Blommaert F *et al.* Inhibition of serum deprivation- and staurosporine-induced neuronal apoptosis by *Ginkgo biloba* extract and some of its constituents. *European Journal of Pharmacology*, 1999, **367**(2-3): 423-430
- [2] van Beek TA, Lelyveld GP. Concentration of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves in relation to the time of year. *Planta Medica*, 1992, **58**: 413-416
- [3] Carrier DJ, Chauret N, Mancini M *et al.* Formation of ginkgolide A in *Ginkgo biloba* cell cultures. *Plant Cell Reports*, 1991, **10**: 256-259
- [4] Jeon MH, Sung S H, Huh H *et al.* Ginkgolide B production in cultured cells derived from *Ginkgo biloba* L. leaves. *Plant Cell Reports*, 1995, **14**: 501-504
- [5] Yu RM(于荣敏), Zhao HL(赵鸿莲), Zhang H(张辉) *et al.* Studies on the cell suspension culture of *Ginkgo biloba* and its metabolites-ginkgolides. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1999, **15**(2): 207-210
- [6] Dai JQ(戴均贵), Zhu WH(朱蔚华), Wu YQ(吴蕴祺) *et al.* Studies on single cell cloning of *Ginkgo biloba* L. *Chin J of Chinese Materia Medica*(中国中药杂志) 2000, **25**(10): 593-596
- [7] Carrier DJ, Laurain D. Plant cell biotechnology of ginkgo. In "Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles", T A. van Beek (ed.), Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000, pp. 81-99
- [8] Mo XI(莫小路), Huang XI(黄学林), Meng A(孟辰). The Chloroplast's differentiation and flavonoids accumulation in suspension culture of *Ginkgo biloba*. *ACTA Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*(中山大学学报) 2003, **42**(6): 94-97
- [9] Amon DJ. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 1949, **24**: 1-15

- Press, 1978
- [ 11 ] Yu XY( 虞杏英 ), Zhuang XP( 庄向平 ), Fang YQ( 方涌强 ) *et al.* Determination of Ginkgolide B in leaves of *Ginkgo biloba* by HPLC. *Chin J Pharm Anal*( 药物分析杂志 ), 1993, **13**( 2 ): 85
- [ 12 ] Yao WX( 姚渭溪 ), Yang C( 杨春 ), Tian Y( 田宇 ) *et al.* Rapid determination of ginkgolides and bilobalide in leaves of *Ginkgo biloba* Lour and its extracts by HPLC. *Chin J Pharm Anal*( 药物分析杂志 ), 1999, **19**( 1 ): 38 – 41
- [ 13 ] Steinke B, Muller B, Wanger H. Biological standard of *Ginkgo biloba* L. *Planta Medica*, 1993, **59**: 155
- [ 14 ] Kriegelstein J. Neuroprotective properties of *Ginkgo biloba* constituents demonstrated *in vivo* and *in vitro*. *Rev Bras Neurol Agosto*, 1994, **30**, suppl 1: 7
- [ 15 ] Ni JJ( 倪静静 ), Huang XI( 黄学林 ), Huang JZ( 黄家总 ) *et al.* Callus culture of ginkgo and content of flavonoid compounds in the calli. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*( 热带亚热带植物学报 ), 2001, **9**( 2 ): 163 – 166
- [ 16 ] Wang GL( 王关林 ), Li CX( 李春斌 ), Fang HJ( 方宏筠 ). Studies on increasing ginkgolides synthesized in suspension cell culture of *Ginkgo biloba* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 2002, **29**( 4 ): 321 – 325
- [ 17 ] Flesch V, Jacques M, Cosson L *et al.* Relative importance of growth and light level on terpene content of *Ginkgo biloba*. *Phytochemistry*, 1992, **31**( 6 ): 1941 – 1945
- [ 18 ] Witte L, Berlin J, Wray V *et al.* Mono- and diterpenes from cell cultures of *Thuja occidentalis*. *Planta Medica*, 1983, **49**: 216 – 221
- [ 18 ] Witte L, Berlin J, Wray V *et al.* Mono- and diterpenes from cell cultures of *Thuja occidentalis*. *Planta Medica*, 1983, **49**: 216 – 221
- [ 19 ] Watts MJ, Galpin IJ, Collin HA. The effect of growth regulators, light and temperature on flavour production in celery tissue cultures. *New Phytol*, 1984, **98**: 583 – 591
- [ 20 ] Huh H, Staba EJ. Ontogenic aspects of ginkgolide production in *Ginkgo biloba*. *Planta Med*, 1993, **59**: 232 – 239
- [ 21 ] Carrier DJ, van Beek TA, van der Heijden R *et al.* Distribution of ginkgolides and terpenoid biosynthetic activity in *Ginkgo biloba*. *Phytochemistry*, 1998, **48**( 1 ): 89 – 92
- [ 22 ] Cartayrade A, Neau E, Sohier C *et al.* Ginkgolide and Bilobalide biosynthesis in *Ginkgo biloba*, I: Sites of synthesis, translocation and accumulation of ginkgolides and bilobalide. *Plant Physiol Biochem*, 1997, **35**( 11 ): 859 – 868

## Studies on the Cell Growth, Differentiation and Terpene Lactone Accumulation in *Ginkgo biloba* Cell Suspension Cultures

MO Xiao-Lu HUANG Xue-Lin\*

( The School of Life Sciences, SUN YAT-SEN University, Guangzhou 510275, China )

**Abstract** To provide supports for *Ginkgo biloba* cell engineering for production of Terpene lactones( Ginkgolides and bilobalide ), the cell suspension were established from calli induced from zygote embryos and stems of 30-day-old seedlings respectively. The relationship between cell growth, differentiation and the terpene lactone accumulation in these suspension cultures were investigated. HPLC determination indicated that the ginkgolide B was found in the embryo derived cell suspension cultures at 0.044% of cell dry weight, and this result was the first time reported in this study. The accumulation of terpene lactone in the suspension cultures derived from both the embryo and seedling stems are effected by the level of the cell differentiation. The ginkgolide B was only found in small cell aggregates in the size smaller than 2mm, and the highest level of ginkgolide B was accumulated in cell aggregates in the size smaller than 1mm; however, the cell aggregates in the size bigger than 3mm could only produced bilobalide and ginkgolide A. In the same size aggregates of the suspension cultures the terpene lactone accumulation is strongly effected by the source of the explant. When the size of cell aggregates was in less than 1mm, the concentration of bilobalide, ginkgolide A and B in the cell suspension cultures derived from the embryos was 2, 1.4 and 0.56-fold, respectively, higher than that of cell cultures derived from seedling stems.

**Key words** Terpene lactone, ginkgolides, cell differentiation, cell suspension culture, *Ginkgo biloba*