

银杏细胞悬浮培养及其银杏内酯产生的研究*

于荣敏 赵鸿莲 张 辉 姚新生

(沈阳药科大学 沈阳 110015)

摘 要 对银杏细胞悬浮培养及其次生代谢产物银杏内酯的产生进行了研究。考察了各种理化因子对细胞生长及银杏内酯产生的影响;对培养物中银杏内酯进行了定性及定量测定。HPLC 测定结果显示,银杏悬浮细胞培养物中银杏内酯的含量可达 0.0099%。

关键词 银杏,银杏内酯,细胞培养

分类号 Q942 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0207-10

银杏组织和细胞培养及其次生代谢产物的研究较多,但因众多因素的限制,1990 年以前一直未能检测到培养物中银杏内酯类成分的存在。1991 年,加拿大的 Carrier 等人首次肯定了组织培养物中银杏内酯的存在^[1]。1993 年,韩国科学家研究表明,其组织培养物中银杏内酯 B 的含量为 0.0009%~0.00038%^[2]。利用银杏树的各种外植体诱导出愈伤组织,并考察了其合成银杏内酯的能力,肯定了来源于银杏无菌苗苗根的愈伤组织合成银杏内酯的能力最强,可达 0.01%^[3]。本文报道银杏细胞悬浮培养及其银杏内酯产生的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

银杏愈伤组织系由银杏种子萌发的无菌苗苗根诱导。诱导的愈伤组织接种于含 40mL/MS(附加 1.0mg/L NAA、0.1mg/L KT 及 30g/L 蔗糖)固体培养基的 100mL 三角瓶中。置于恒温培养箱中(25℃±1℃),暗培养或在培养架上 24h 光照培养。愈伤组织每 24d 继代一次,经过 1 年驯化培养得到无性细胞系。

1.2 细胞悬浮培养体系的建立

将生长旺盛、结构疏松、易于分散的愈伤组织接种于无菌皿中,用接种铲轻轻压平,均分成两份:一份测其干重,换算折干率;另一份转入液体培养,接种量控制在 2.5~3g 湿重。细胞悬浮培养的培养基见文献[3],但不加琼脂,灭菌方法同上。250mL 三角瓶中分装 65mL 液体培养基,培养温度 25℃±1℃,暗培养,置旋转式摇床转速为 120r/min,振幅 2.5cm,悬浮培养细胞生长 18d 收获。

1.3 细胞悬浮培养实验参数的测定

以细胞干重为生长指标,所得试样为 3~6 个平行试样的平均值。折干率、细胞生长

* 辽宁省自然科学基金资助项目(No. 519027)。

收稿日期:1998-03-23,修回日期:1998-12-06。

量和相对生长速度的计算见文献[3]。

1.4 悬浮细胞培养物中银杏内酯的定性鉴别和定量测定

用 TLG 和 HPLC 的定性鉴别和定量测定方法见文献[3]。

2 结果和讨论

2.1 细胞悬浮培养生长因子的考察

2.1.1 接种量：本实验考察了 15、25、40、50、75g/L 接种密度，结果显示：40、50、75g/L 的细胞密度，细胞倍增量最大，尤以 40g/L 的接种量为最佳。

2.1.2 培养基用量：在 250mL 培养瓶中加入 30、65、85、100、120mL 的培养基。结果表明，在 250mL 培养瓶中加 65mL 的培养基最适于细胞生长。

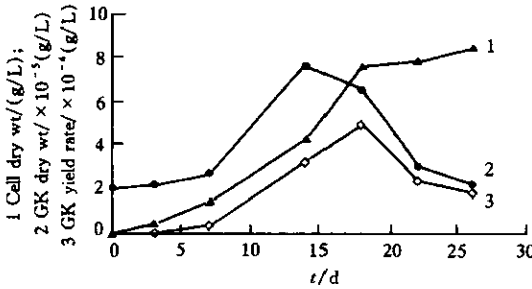


图 1 悬浮培养细胞生长曲线与银杏内酯含量的变化

Fig. 1 The time course of production-growth in the suspension culture of *G. biloba*

2.2 细胞生长曲线与银杏内酯含量的变化

悬浮细胞培养与愈伤组织培养的生长曲线近似，均为 S 型。但前者的生长周期较短，在第 18d 即进入平稳期；此外，悬浮细胞培养也比愈伤组织培养生长速度快，其最大相对生长速度是愈伤组织培养的 1.4 倍(图 1)。在悬浮培养细胞生长到第 14d 时，银杏内酯含量达到最大值。由于产率是由细胞生长量及银杏内酯含量的综合

因素决定，所以尽管在培养到第 14d 时银杏内酯含量达到最大值，但其生长量仍较低，在第 18d 时即对数生长期末期，银杏内酯的含量有所下降，但产率最高。故本实验皆取产率最高时，即生长至第 18d 时收获细胞。

2.3 碳源对悬浮细胞生长及银杏内酯含量的影响

2.3.1 蔗糖与葡萄糖不同配比对细胞生长的影响：Carrier 等^[1]在研究银杏细胞培养胞外培养物质的吸收方式时，指出蔗糖在被吸收前先分解成葡萄糖和果糖。我们单独使用葡萄糖，甚至增加到 60g/L 时，对细胞生长的促进作用也不大，说明细胞生长需要果糖。在 S/G<6 时，其生长促进作用随 S/G 比例的提高而增强；但当 S/G>6 时，细胞的生长能力却随着两者比例的增加而降低。另外，蔗糖与葡萄糖配合使用时，对细胞生长最显著的促进作用与单独使用蔗糖相比，仍以蔗糖 30g/L 时的细胞生长量最高(图 2)。

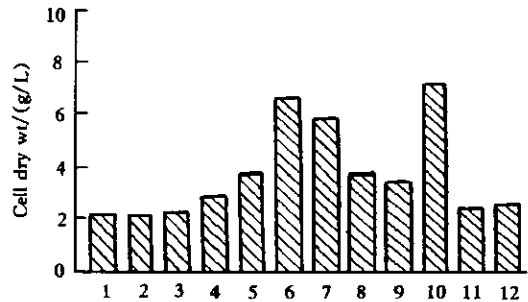


图 2 蔗糖与葡萄糖不同配比对细胞生长的影响

Fig. 2 The influence of ratio of sucrose and glucose on the growth of cells

No. Sugar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Suc/(g/L)	15.0	20.0	22.5	24.0	25.0	25.7	26.2	26.7	27.0	30.0	—	—
Glu/(g/L)	15.0	10.0	7.5	6.0	5.0	4.3	3.8	3.3	3.0	—	30.0	60.0
S/G	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	—	—	—

* Suc:Sucrose; Glu:Glucose; S/G:Sucrose/Glucose

2.4 pH 值对细胞生长和银杏内酯含量的影响

细胞生长:实验结果显示,悬浮细胞培养的最优 pH 值为 5.7。而收获时培养液的 pH 值均处于 5.0±0.1 范围内,与初始 pH 无关,表明银杏细胞具有自我调节其生活环境的能力(图 3)。银杏内酯含量与产率:pH 对银杏细胞培养物中银杏内酯的含量与产率变化的趋势近似,均以 pH5.7 为最佳(图 3)。

2.5 营养添加剂对细胞生长的影响

研究结果表明,酪朊水解物(LH)与酵母提取物(YE)具有抑制细胞生长的作用,尤以酵母提取物作用最为突出;此外,可溶性淀粉(ST)对细胞生长影响不大(图 4)。

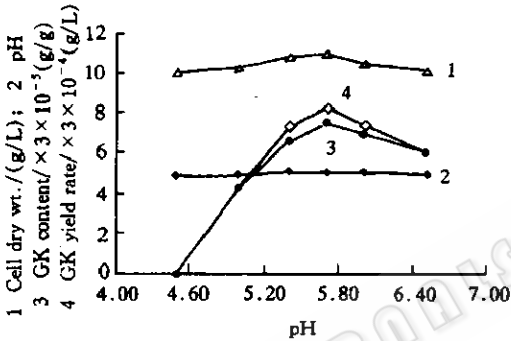


图 3 pH 对细胞生长和银杏内酯含量的影响
Fig.3 The effect of pH on the growth of cells and the content of ginkgolides of *G. biloba*

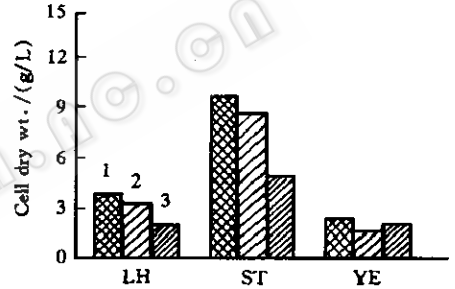


图 4 营养添加剂对细胞生长的影响
Fig.4 The influence of additives on the cell growth of *G. biloba*
1. 0.5g/L; 2. 1.0g/g; 3. 5.0g/L

2.6 2,4-D 与 KT 对细胞悬浮培养及银杏内酯合成的影响

2.6.1 2,4-D对细胞生长及银杏内酯含量的影响:研究结果(图 5)显示:培养基中加入 2,4-D(8mg/L)时,其最高细胞生长量为 9.25g/L,培养细胞表面嫩白色,生长健康。

以 2,4-D 为生长素培养细胞时,只检测到银杏内酯 B 的存在,且细胞生长量、银杏内酯含量及产率均随着 2,4-D 浓度的增加而增大。当 2,4-D 浓度为 8mg/L 时,银杏内酯含量达到最大值 0.99×10^{-4} 。

2.6.2 悬浮细胞培养物与愈伤组织培养物中银杏内酯含量比较:表 1 表明愈伤组织培养可以合成银杏内酯 A 和 B,但后者

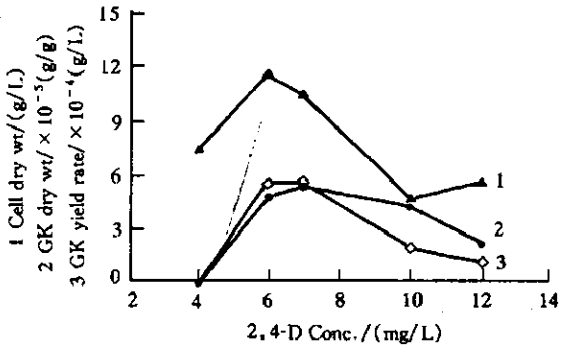


图 5 2,4-D 对细胞生长和银杏内酯含量的影响
Fig.5 The influence of 2,4-D on the cell growth and the content of ginkgolides of *G. biloba*

表1 不同培养方式对银杏内酯含量及其产率的影响
Table 1 The comparison of ginkgolides in different cultures

Culture methods	Period of culture /d	RGR* /d ⁻¹	GKA /10 ⁻⁴ (g/g)	GKB /10 ⁻⁴ (g/g)
Callus culture	20	0.039	0.14	0.90
	30	0.042	0.44	1.01
Cell culture	18	0.068	0.00	0.99

2,4-D Conc./ (8mg/L); * RGR: Relative growth rate

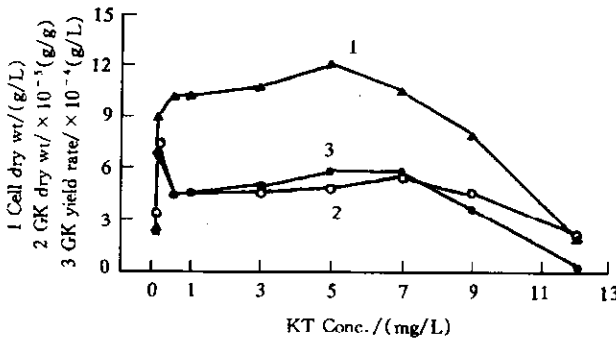


图6 KT对细胞生长和银杏内酯含量的影响

Fig. 6 The effect of KT on the cell growth and the content of ginkgolides of *G. biloba*

于后者 GKB 略高,故产率相近。加入高浓度的 KT(5mg/L),不利于 GKB 的合成。既能促进细胞生长又不影响银杏内酯合成的 KT 浓度为 0.1mg/L(图 6)。

HPLC 测定结果显示,银杏悬浮细胞培养物中银杏内酯 B 的含量可达 0.0099%。在给定的测试条件下,其它成分的干扰较小,这也为利用细胞工程方法大规模生产银杏内酯 B 奠定了较好的理论基础和实验根据。

参 考 文 献

- [1] D. J. Carrier, N. Chauret, M. Maneini *et al.* *Plant Cell Rep.*, 1991, 8: 635~638.
- [2] Y. C. Kim, M. H. Jeon, S. H. Sung *et al.* *PCT Int. Appl.* WO 9302, 204(CL. C12p17/D), 04 Feb 1993.
- [3] 于荣敏, 赵鸿莲, 郑玉果等. 生物工程学报, 1999, 15(1): 58~65.

Studies on the Cell Suspension Culture of *Ginkgo biloba* and Its Metabolites-ginkgolides

Yu Rongmin Zhao Honglian Zhang Hui Yao Xinsheng
(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015)

Abstract The production of ginkgolides in cell suspension culture of *Ginkgo biloba* was reported. Some physical factors and chemical substances affected the cell growth and the production of ginkgolides were investigated. The quantitative method of ginkgolides with HPLC was used in all kinds of cell cultures. The result showed that the content of ginkgolides B in the cultures is 0.0099%.

Key words *Ginkgo biloba*, ginkgolides, cell culture, HPLC