

银杏愈伤组织培养及其代谢产物银杏内酯的研究*

于荣敏 赵鸿莲 郑玉果 姚新生 张 辉

(沈阳药科大学 沈阳 110015)

摘 要 筛选出了愈伤组织生长的最佳培养基,考察了各种理化因子对培养细胞生长及银杏内酯产生的影响,应用生物法和 HPLC 对愈伤组织中的银杏内酯 A 和 B 进行了成功的测试。结果显示,银杏愈伤组织培养物中银杏内酯的含量可达 0.01%,属国际领先水平。

关键词 银杏,银杏内酯,愈伤组织培养,HPLC,生物法

分类号 Q494.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0052-58

银杏(*Ginkgo biloba* L.)为一珍贵药用植物,内含银杏内酯、黄酮体、氨基酸等活性成分,药用价值很大。银杏内酯(Ginkgolides)主要存在于银杏的根、叶中,是仅发现于银杏中的带有特丁基的二萜内酯类化合物。活性测试结果表明,银杏内酯独特的 C₂₀ 结构具有显著的 PAF(Platelet Activating Factor)拮抗作用,且尤以银杏内酯 B 的活性最强^[1~2]。被公认为是治疗气管炎、哮喘、内毒素休克、器官免疫排斥反应等多种炎症疾病的新型治疗剂^[3~5]。但由于银杏内酯在天然植物中含量很低(0.001%~0.01%),故植物细胞培养成为人们寄予厚望的工业化生产银杏内酯的最佳选择之一。

银杏组织和细胞培养研究较多,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的存在。1991 年,加拿大的 J. Carrier 等人首次肯定了组织培养物中银杏内酯的存在^[6]。1993 年,韩国科学家研究表明,其组织培养物中银杏内酯的含量为 0.0009%~0.0038%^[7]。

作者首次在国内利用银杏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,应用 HPLC 和 PAF 生物测试法测定了来源于银杏根的愈伤组织中的银杏内酯含量。

1 材料和方法

1.1 材料

银杏愈伤组织由银杏种子萌发的无菌苗根诱导。诱导的愈伤组织在含 3% 蔗糖,并附加 1.0mg/L NAA、0.1mg/L KT 的 MS 培养基上,于恒温培养箱(架)中(25℃±1℃)培养,每 24d 继代一次,经过一年驯化培养得到无性细胞系。

* 辽宁省自然科学基金资助项目(No. 519027)。

收稿日期:1997-12-19,修回日期:1998-05-13。

1.2 培养方法

1.2.1 基本培养基的考察:选择 5 种常用培养基,考察其对银杏叶、胚、根、茎和柄的愈伤组织诱导效果,添加激素 NAA 1.0mg/L,KT 0.1mg/L,每天光照 8h,连续培养 30d。

1.2.2 愈伤组织的继代培养:愈伤组织培养在经 121℃、0.1MPa 消毒 20min,并附加 1.0mg/L NAA 0.1mg/L KT 及 30g/L 蔗糖的 MS 培养基上,接种于含 40mL 固体培养基的 100 mL 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。

1.3 测定方法

1.3.1 愈伤组织生长实验参数的测定:以愈伤组织干重为生长指标,所得试样为 6~10 个平行试样的平均值。

接种量 = 接种后瓶重 - 接种前瓶重 (g/瓶)

= 载有样品的皿重 - 空皿重 (g/块)

收获量 = 收获前瓶重 - 收获后瓶重 (g/瓶)

载有收获样品的皿重 - 空皿重 (g/块)

折干率 = $\frac{\text{愈伤组织干重}}{\text{愈伤组织湿重}} \times 100\%$

愈伤组织生长量 = 收获量 - 接种量 (g/瓶 g/块)

相对生长速度 = $\frac{1}{t} \lg \frac{W_2}{W_1} (\text{d}^{-1})$

t. 生长时间 (d); W₂. 收获干重 (g); W₁. 接种干重 (g)

1.3.2 银杏内酯定性鉴别:本实验对根愈伤组织培养物中银杏内酯进行了 TLC 和 HPLC 的定性鉴别。TLC 层析条件:硅胶 G 板,醋酸钠饱和,以水饱和和乙酸乙酯展开,取出,晾干,喷醋酐后,于 140℃ 下加热 20min,254nm 紫外光下观察,在与银杏内酯 B 标准品相同位置上呈淡绿色斑点。HPLC 法测定条件 (1) 洗脱剂:异丙醇-甲醇-水 (10:15:75),流速 0.5mL/min,纸速 1mm/min,进样量 10μL (2) 洗脱剂:甲醇-水 (45:55),流速 1.0mL/min,纸速 2mm/min,进样量 5μL。

1.3.3 愈伤组织的生物 (PAF) 定量法:仪器:血小板聚集仪:Chrono-LOG Corporation Whole-Blood Agro-meter; 显微镜:OLYMPUS (JAPAN) BH-2; 离心机:LD4-2 型低速离心机 (北京医用离心机厂)。试剂:PAF (C-18):ヲフナコシ药品株式会社,配制成 5.52mg/L 的蒸馏水,分装于小安瓶内冻干,冷冻保存,用时以生理盐水溶解,摇匀即用;甲醇:分析纯 (沈阳化学试剂厂);枸橼酸钠:分析纯 (沈阳试剂四厂)。

银杏内酯 B 标准品的 IC₅₀ 测定:配制银杏内酯 B 的一系列浓度的标准溶液,测定由 PAF 诱导的血小板聚集曲线,计算抑制率,取 3 次测定的平均值,作出工作曲线,求出银杏内酯 B 的 IC₅₀。

样品的 IC₅₀ 测定:由于银杏中只有银杏内酯选择性地抑制 PAF 诱导的血小板聚集作用,而其它成分如黄酮体则无此作用,故比较组织培养物与银杏内酯 B 的 IC₅₀ 值,即可求出样品中等效银杏内酯 (GKB) 的含量。等效银杏内酯 B 的活性实际上是样品中含有的银杏内酯 A、B、C 等各银杏内酯活性的总和,其中以银杏内酯 B 的活性为主。据文献 [8]

报道,银杏内酯 A、B、C 的强度比为 5:22:1,以及样品中各银杏内酯的比例,利用等效银杏内酯 B 含量可进一步按下式计算样品中的总银杏内酯含量。

$$\text{总银杏内酯含量 \%} = \frac{\text{等效 GKB} \times 22}{\text{GA} \% \times 5 + \text{GB} \% \times 22 + \text{GC} \% \times 1}$$

实验系取根愈伤组织,配制不同浓度的甲醇溶液,同上法测试血小板聚集率,并以甲醇作空白对照,计算抑制率,求出 IC_{50} 。

1.3.4 HPLC 测定银杏内酯含量:将愈伤组织置红外灯下 60°C 干燥至恒重。每次称取研碎的愈伤组织培养物 2g 进行定量分析。高效液相色谱仪:日本岛津公司 LC-10AD, RID-6A 示差检测器, C-R6A 记录仪; TGL-16B 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); HSC-20R-A 高速冷冻离心机(图门市离心机厂)。银杏内酯的提取分离方法参考文献 [9]。

色谱条件:色谱柱:Inertsil ODS 柱 $4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$ $5\mu\text{m}$, GL Science Inc. 流动相:甲醇-水 = 45:55; 流速: $1.0\text{mL}/\text{min}$; 灵敏度 0.5×10^{-4} ; 纸速 $2\text{mm}/\text{min}$; 进样量 $5\mu\text{L}$ 。

测定方法:精密吸取样品,注入高效液相色谱仪,测定峰面积,用内标法计算银杏内酯含量。计算公式如下:

$$\text{GA} = \frac{\text{峰面积}(\text{GA})}{\text{峰面积}(\text{W}_{\text{内}})} \times \text{W}_{\text{内}} \times 1.30$$

$$\text{GB} = \frac{\text{峰面积}(\text{GB})}{\text{峰面积}(\text{W}_{\text{内}})} \times \text{W}_{\text{内}} \times 1.36$$

注: $\text{W}_{\text{内}}$ = 加入内标物苯甲醇的质量 = 内标液体积 ($20\mu\text{L}$) \times 内标液密度 ($2.09\text{g}/\text{mL}$); 1.30, 1.36 分别为 GA, GB 与内标物苯甲醇的相对重量校正因子。

HPLC 测定结果见表 2。

2 结果和讨论

2.1 基本培养基的选择

由表 1 可见,不同外植体愈伤组织的诱导,其最适培养基亦不同。叶及叶柄的最适培养基为 B5,茎的最适培养基为 N6,根在各培养基上的诱导效果都不理想。MS 培养基对大多数愈伤组织的诱导都比较适宜,而 H 培养基对各器官部位的愈伤组织诱导都很差。实验结果如表 1。

表 1 培养基对银杏愈伤组织生长的影响

Table 1 The influence of media on callus growth of *G. biloba*

Media ^[10]	MS	H	B5	6,7-V	N6
Leaves	++++	+	+++	++	++
Embryo	+++	-	++++	+++	++
Root	+	-	-	-	-
Petiole	++++	+	+++	++	++
Stem	+++	+	++	++	++++

“-” No callus, “+” The rate of induction is below 20%; “++” The rate of induction is between 20% ~ 50%; “+++” The rate of induction is between 50% ~ 80%; “++++” The rate of induction is between 80% ~ 100%.

2.2 不同理化因子对愈伤组织生长的影响

2.2.1 NH_4^+ 或 NO_3^- 对愈伤组织生长的影响：取新鲜根愈伤组织于无菌条件下接入含有不同浓度配比的 NH_4^+ 和 NO_3^- 的 MS 培养基中(附加 1.0mg/L NAA, 0.1mg/L KT 的 MS 培养基, 即 $\text{N}_{1.0}\text{K}_{0.1}$ MS 培养基)暗培养 26d 收获, 结果见图 1。(如无特殊说明, 下文用于愈伤组织生长测定的培养条件皆同, 以干重为指标)。

实验结果表明 (1) 由于 NH_4^+ 是愈伤组织生长过程中氮源的主要吸收形式之一。所以, 如以 NO_3^- 为培养基中唯一氮源时, 其愈伤组织生长量仅为 MS 基本培养基(对照组)的 0.4 倍; (2) $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 用量均为 20.6mmol/L 时, 愈伤组织生长情况最差, 其生长量仅为对照组的 23%; (3) 当 NH_4^+ 与 NO_3^- 浓度分别为 20.6mmol/L 和 30.0mmol/L 时, 愈伤组织生长量是 MS 基本培养基的 1.3 倍。显著促进愈伤组织的生长。

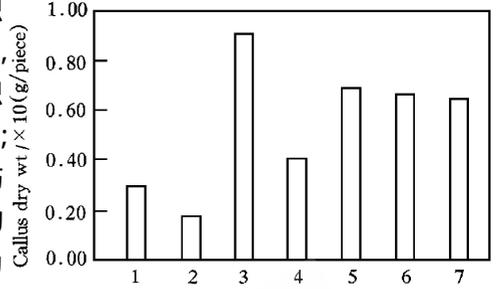


图 1 氮源对银杏愈伤组织生长的影响

Fig. 1 The influence of nitrogen source on the growth of calli

No.	1	2	3	4	5*	6	7
NH_4^+ (mmol/L)	0	20.6	20.6	41.2	20.6	10.3	20.6
NO_3^- (mmol/L)	18.8	20.6	30.0	60.0	39.4	29.1	58.2

Note: * The quantum used in standard MS medium^[10].

2.2.2 磷酸盐对愈伤组织生长的影响：配制 $\text{N}_{1.0}\text{K}_{0.1}$ MS 培养基, 其中 NH_4^+ 20.6mmol/L, NO_3^- 30.0mmol/L。磷酸盐中的磷是细胞膜及核酸等生命物质的重要组成部分, 如缺乏, 对愈伤组织生长影响很大。本实验结果显示, 如缺乏磷酸盐(如 KH_2PO_4), 愈伤组织水分含量较大, 表面黄褐色, 基部老化, 其生长量亦降低了 72%, 故磷酸盐是愈伤组织生长不可缺少的营养成分之一。

2.2.3 肌醇对愈伤组织生长的影响：考察了在 $\text{N}_{1.0}\text{K}_{0.1}$ MS 培养基中附加 0.05~0.3mg·mL⁻¹ 的肌醇对愈伤组织生长的影响(图 2)。结果显示, 培养基中附加 0.1mg·mL⁻¹ 肌醇对愈伤组织生长的影响最显著, 随着肌醇浓度的增加, 生长受到抑制。

2.2.4 pH 对愈伤组织生长的影响：pH 是影响愈伤组织生长的一个重要因素。pH 环境影响质膜的渗透性及愈伤组织对营养物质的吸收程度。将 $\text{N}_{1.0}\text{K}_{0.1}$ MS 培养基调至不同 pH 值, 结果(图 3)表明: pH 5.7 以下, 对生长促进作用不大, pH 5.7~6.2 具有一定缓冲力, 对生长皆有促进作用, pH 5.7~5.8 对生长促进作用最显著。

2.2.5 愈伤组织生长曲线：由生长曲线(图 4)可知, 愈伤组织生长曲线大致呈 S 型, 在 0~7d 处于生长延迟期, 生长速度接近于零。在此阶段的后期, 曲线略有上升; 之后进入对数生长期, 在 7~20d 期间, 愈伤组织生长速度明显加快, 生长量增加显著, 是延迟期的 6.7 倍, 在对数生长期的 20~24d 中, 愈伤组织生长速度最快, 生长倍增量达延迟期的 13 倍, 24~35d 处于生长平稳期。从愈伤组织生长曲线看, 最适继代时间为第 24d, 也是细胞培养的最适转接时间。

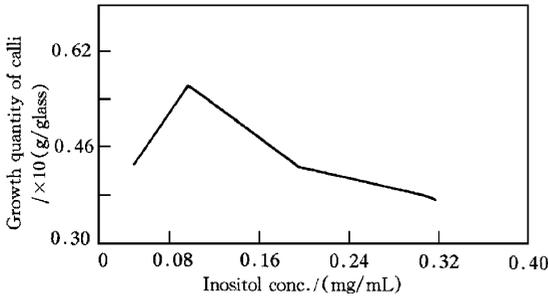


图2 肌醇对银杏愈伤组织生长的影响

Fig.2 Effects of different inositol concentrations on callus growth of *G. biloba*

0.1mg/L。

2.3.2 2,4-D对愈伤组织生长及银杏内酯含量的影响:由图6可知(1)随着2,4-D浓度的增加,愈伤组织生长量也逐渐增加。当2,4-D浓度达到6mg/L时,愈伤组织生长量最大。之后,随着2,4-D浓度的增加,愈伤组织生长量逐渐减少。培养20d和培养30d的愈伤组织的生长规律相似(2)相同培养条件下,随着培养时间的延长,愈伤组织生长量亦增加。培养30d的愈伤组织最高生长量比培养20d的愈伤组织提高了35%(3)2,4-D对愈伤组织中银杏内酯A的影响不大。

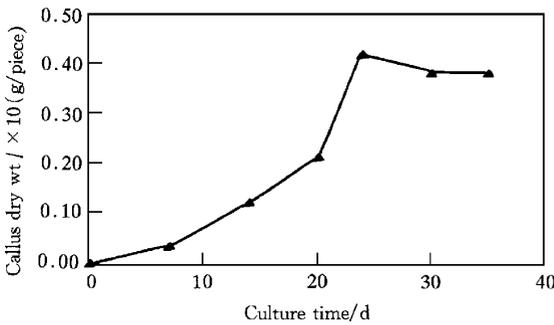


图4 银杏愈伤组织生长曲线

Fig.4 The time-course of callus growth of *G. biloba*

2.3 植物生长调节因子对愈伤组织生长的影响

2.3.1 NAA和IBA对愈伤组织生长的影响:由图5可知,当附加0.1ml/L的KT,考察生长素的作用时,附加NAA的愈伤组织生长最大值是附加IBA的2倍,说明NAA作用明显优于IBA;此外,KT浓度为0.1mg/L时,愈伤组织生长随NAA浓度的增加,渐次递减,呈负相关性。由图5还可看出,促进愈伤组织生长的最佳激素组合是NAA 1.0mg/L,KT

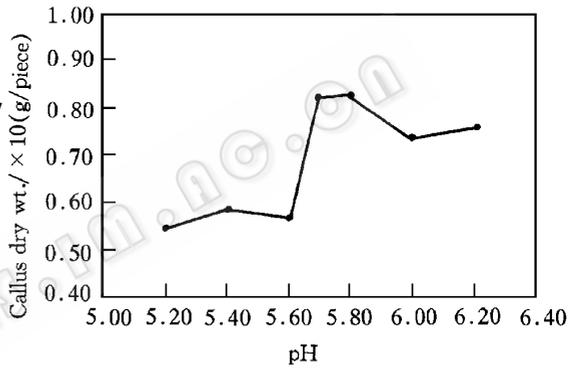


图3 pH对银杏愈伤组织生长的影响

Fig.3 The influence of pH on the growth of calli of *G. biloba*

对于培养20d的愈伤组织而言,银杏内酯B的含量随着2,4-D浓度的增加而逐渐加大,浓度为8mg/L时,银杏内酯B的含量达到最大值(0.90×10^{-4}),而对于培养30d的愈伤组织,其规律与培养20d的类似,其峰值也为8mg/L,银杏内酯B的含量为 1.01×10^{-4} (见表2)。由图6尚知,培养20d的愈伤组织在2,4-D浓度为8mg/L时,按活性计算的银杏内酯的总含量最大;而对于培养30d的愈伤组织来说,银杏内酯总量以10mg/L时为最高。

由图6可以看出,虽然培养20d的愈伤组织中的银杏内酯含量较培养30d的为低,但后者的细胞产率却是前者的2倍多,并呈现一定的规律性,且以2,4-D浓度为8mg/L时产率最大。由于产率是相对于生长和含量两因素而言,故考虑综合指标银杏愈伤组织在

2 A-D 培养条件下生长 30d 时 ,适宜浓度为 8mg/L。

2.4 血小板聚集法测定等效银杏内酯 B 的含量

由表 3 可见 ,PAF 法测得根愈伤组织中等效银杏内酯 B 的含量为 113mg/mL ,略高于 HPLC 所测含量 ,这主要是由于 PAF 法具有选择性强、灵敏度高(定量检出限达 3.8μmol/mL)等特点 ,且样品不经预先分离纯化处理 ,所含成分损失较少 ,故测定值较高的缘故。

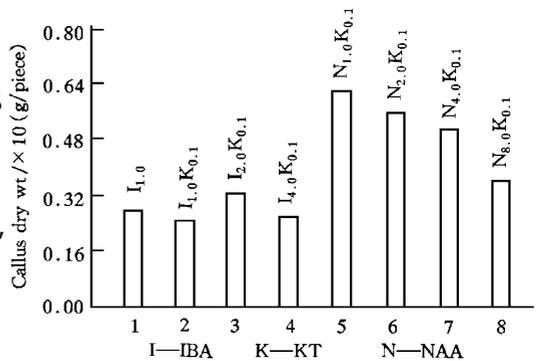


图 5 NAA 和 IBA 对愈伤组织生长的影响
Fig. 5 Effect of NAA and IBA on the growth of calli of *G. biloba*

表 2 在不同培养时间 2 A-D 对愈伤组织中银杏内酯 B 含量的影响

Table 2 Effects of different period of culture supplemented with 2 A-D on the content of GB in calli

2 A-D Conc. (mg/L)	GB/ × 10 ⁻⁴ (g/g)						
	1	2	4	6	8	10	12
20d	0.11	0.11	0.25	0.29	0.90	0.74	0.46
30d	0.14	0.15	0.29	0.77	1.01	0.96	0.56

表 3 根愈伤组织 IC₅₀测定结果

Table 3 Datasheet of IC₅₀ of callus of root in *G. biloba*

Conc. (g/mL)	0.2	0.1	0.08	0.06	KC
AR/%	36	41	49	56	100
IR/%	64	59	51	44	
IC ₅₀	0.07g/mL				
EC of GB	113mg/mL				

AR :Aggregation rate ; IR :Inhibition rate ; EC :Equivalent concentration

3 结 论

本文首次在国内采用固体培养法对组织培养法生产银杏内酯进行了研究 ,筛选出了银杏内酯高产细胞系 ,银杏内酯含量达万分之一 ,与天然植物含量相当 ,属国内外领先水平 ;此外 ,本实验首次将选择性的生物定量法 (PAF 诱导的血小板聚集法)应用于组织培养物中银杏内酯的检测 ,并对银杏内酯检测的 HPLC 法进行了改进 ,使之能够适用于组织培养物中银杏内酯的检测 ;本文尚全面考察了各种培养

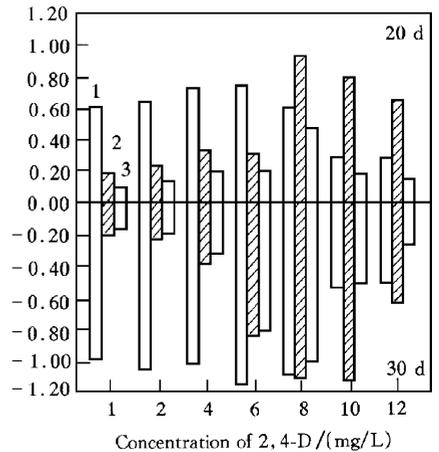


图 6 2 A-D 对银杏愈伤组织不同生长时间及银杏内酯含量的影响
Fig. 6 The influence of 2 A-D on the growth of calli in different period and its content of ginkgolides
1. Growth quantity of calli/3x (g/glass) ;
2. Content of GK/10⁻⁴ (g/g) ;
3. Yield rate of GK/2.5x10⁻⁴ (g/glass)

基对银杏不同外植体的愈伤组织的诱导情况,得到了不同外植体的最适培养基,全面考察了MS培养基中各成分对愈伤组织诱导及生长的影响,考察了各种生长激素以及光照对愈伤组织合成银杏内酯能力的影响,肯定了银杏内酯在根愈伤组织中的合成不需要光照,为下一步银杏细胞(发酵)培养奠定了较好的基础。

参 考 文 献

- [1] K. Kurihama, A. T. Wadlaw, R. Moqbel *et al.* *Clin Immunol/Lunol*, 1989, **83**: 83~90.
 [2] P. Braquet. *Drugs of Future*, 1987, **12**: 643~646.
 [3] 杨义芳, 吴国友. 现代应用药学, 1995, **12**(5): 12~15.
 [4] 杨义芳, 吴国友. 现代应用药学, 1995, **12**(6): 5~9.
 [5] 李光仪, 刘明登. 中草药, 1995, **26**(2): 100~104.
 [6] D. J. Carrier, N. Chauret, M. Maneini *et al.* *Plant Cell Rep*, 1991, **8**: 635~638.
 [7] M. H. Jeon, S. H. Sung. PCT Int. Appl WO 9302 204 (CL. Cl2P17/D) 04 Feb 1993.
 [8] B. Steinke. *Plant Med*, 1993, **59**(2): 150~160.
 [9] 虞杏英. 药物分析杂志, 1993, **13**(2): 85.
 [10] R. Endress. *Plant Cell Biotechnology*, Berlin Springer-Verlag, 1994, 39~40.

Studies on the Callus Culture of *Ginkgo biloba* and its Metabolites-ginkgolides*

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

Abstract The production of Ginkgolides in callus culture of *Ginkgo biloba* was reported. The affection of some physical factors and chemical substances on the induction and growth of calli was also investigated. A biologically quantitative method (platelet aggregation induced by PAF) and HPLC were successfully used for the determination of Ginkgolides A and B in all kinds of callus cultures. The result showed that the content of Ginkgolide B in the callus cultures varies from 0.005% to 0.01%, which is one of the best result for the callus culture of *G. biloba* in the world.

Key words *Ginkgo biloba*, ginkgolides, callus culture, HPLC, PAF