

软加工成枫斗;而 F型铁皮石斛居群的植株因其茎秆柔软可被加工成铁皮枫斗。

优质的铁皮枫斗味甘富粘性,被传统认为是枫斗药材的上乘品质特征。经过观察,铁皮石斛的粘性成分属基本组织细胞中的多糖类成分。前人通过研究认为石斛多糖具有显著的养阴生津功效^[3]。F型居群铁皮石斛的茎秆粗壮柔软,细胞含有丰富的粘性多糖成分,因此,由它加工成的铁皮枫斗具增强人体免疫功能、防癌抗癌、恢复嗓音等显著功效^[4],价格昂贵。H型铁皮石斛,虽不适宜加工成铁皮枫斗,但因其细胞中也含有一定的淀粉及少量多糖成分而被民间煮水饮服,具有一定的功效且价格便宜,在开发利用时应予以重视

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 2000年版.

[2] 徐珞珊,徐国钧,沙文兰,等. 中药石斛显微鉴定研究 [J]. 南京药学院学报, 1980, (2): 1-4.
 [3] 王宪楷,赵同芳. 石斛属植物化学成分与中药石斛研究 [J]. 药学通报, 1986, 21(11): 666-669.
 [4] 付开聪,连守臣,冯德强,等. 黑节草资源的应用与开发 [J]. 中草药, 1999, 30(9): 708-711.
 [5] 刘瑞驹,蒙爱东,邓锡青,等. 铁皮石斛试管苗快速繁殖的研究 [J]. 药学学报, 1988, 23(8): 636-640.
 [6] 刘 骅,张治国. 铁皮石斛试管苗壮苗培养基的研究 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(11): 654-656.
 [7] 王光远,许智宏,蔡德发,等. 铁皮石斛的离体开花 [J]. 中国科学(C辑), 1997, 27(3): 229-234.
 [8] 丁亚军,吴庆生,于力文. 铁皮石斛最佳采收期的理论探讨 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(8): 458-460.
 [9] 王康正,高文远. 石斛属药用植物研究进展 [J]. 中草药, 1997, 28(10): 633-635.
 [10] 陈心启,吉占和,罗毅波. 中国野生兰科植物彩色图鉴 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
 [11] 陈心启,吉占和. 中国兰花全书 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1998.
 [12] 吉占和. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.

银杏悬浮细胞系选育及继代培养中银杏内酯合成稳定性研究

刘佳佳¹,江文辉¹,郭 勇²,郑穗平^{2*}

(1. 中南大学 中药现代化研究中心 岳麓校区,湖南 长沙 410083; 2. 华南理工大学 食品与生物工程学院,广东 广州 510641)

摘要: 目的 选育高产银杏内酯悬浮细胞系,并对其在继代培养过程中银杏内酯 B合成的稳定性进行研究。方法 以银杏优良品种的种子萌发幼苗诱导愈伤组织,考察了不同培养基对愈伤组织生长和银杏内酯 B产生的影响,采用缺氧胁迫法从诱导的愈伤组织中选育高产银杏内酯 B悬浮细胞系,并进行驯化培养。结果 选出了 7个细胞系,其合成银杏内酯 B的能力比选育前的愈伤组织有了显著提高,其中细胞系 M H-3培养周期 18 d,细胞生物量增加 3.71倍,银杏内酯 B含量达到 302 μ g/g DW,比选育前提高了 172.7%,为国内领先水平。在摇瓶培养时其合成银杏内酯的能力稳定,连续培养 6代,银杏内酯 B的平均含量为 291 μ g/g DW,变异系数为 0.131。结论 采用该路线选育的银杏悬浮细胞系银杏内酯 B产量高,在继代培养过程中合成代谢较稳定。

关键词: 银杏内酯;悬浮细胞系;继代培养;稳定性

中图分类号: R282.13 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)09-0831-04

Selection of *Ginkgo biloba* cell line for suspension culture and studies on stability of ginkgolide B in subculture

LIU Jia-jia¹, JIANG Wen-hui¹, GUO Yong², ZHENG Sui-ping²

(1. Centre of Traditional Chinese Medicine Modernization, Central-South University, Changsha Hunan 410083, China; 2. College of Food Engineering and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou Guangdong 510641, China)

Abstract Object To select the cell line of *Ginkgo biloba* L. that may produce high yield of ginkgolide B (GB) in suspension culture and to study the stability of GB in subculture. **Methods** Calculus was induced with stem, root and leaf of selected elite species and high yield suspension cell lines chosen by hypoxia stress. **Results** Seven suspension cell lines with improved yield of GB were obtained. Among which cell line M H-3 gave a 3.71 fold increase of cellular bioproduct with an increased content up to 302 μ g/g

* 收稿日期: 2000-10-27

基金项目: 广东省自然科学基金(No. 990865)和中南大学科研基金资助项目

作者简介: 刘佳佳(1963-),男,工学博士,副教授,从事天然产物的研究与开发。研究方向: 次生代谢物的代谢调控与结构修饰,活性成分的筛选与提取分离工艺。Tel (0731) 8836125

DW after culturing for 18 d, a leading record country wide. In shaking bottle culture, it showed a consistent yield of GB with a content of $291 \mu\text{g/g}$ DW in 6 successive subcultures, coefficient of variation = 0.131. **Conclusion** The suspension cell line selected by hypoxia stress gave a higher yield and stability in successive transfer culture.

Key words ginkgolide B (GB); suspension cell lines; subculture; stability

银杏叶中所特有的银杏内酯 (ginkgolides, GK) 是血小板活化因子 (PAF) 受体的特异拮抗剂, 对治疗心脑血管疾病、哮喘、内毒素休克, 增强人体免疫力、抑制器官移植的排异反应有较好的效果^[1], 具有广阔的市场前景, 但含量极低。为满足市场需要, 科学工作者对银杏内酯的化学合成进行了研究, 1988年 Corey^[2]报道了银杏内酯的全合成, 但步骤复杂, 很难工业化生产。为此, Carrier等^[3]在90年代初就开始细胞培养生产银杏内酯的研究, 国内的于荣敏、戴均贵等^[4,5]也开始了细胞培养生产银杏内酯的研究, 银杏悬浮细胞培养物中银杏内酯的含量达到0.009%。实现细胞大规模培养生产银杏内酯的关键技术之一是要有银杏内酯生产能力强、性状稳定的悬浮细胞系。为此, 从1997年开始, 我们进行本项研究并已取得良好进展。

1 材料与方法

1.1 实验材料: 选用银杏优良品种桐子果 *Ginkgo biloba* cv. *Tongzigua* 梅核I号 *Ginkgo biloba* cv. *Meihe* 小佛手 *Ginkgo biloba* cv. *Xiaofushou* 实生苗当年生根, 茎、叶作为诱导愈伤组织的外植体, 接种于含3%蔗糖、1%琼脂、3.0 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L KT的MS培养基上, 于恒温培养箱中25℃、黑暗条件下诱导, 30 d后转入继代培养基上进行继代培养。

1.2 愈伤组织的培养: 选择MS Bs SH和White 4种常用培养基, 考察其对银杏愈伤组织生长和银杏内酯B合成的影响, 每种培养基添加3%的蔗糖、1%琼脂、3.0 mg/L 2,4-D、0.4 mg/L KT, 于恒温培养箱中25℃, 每天24 h光照培养, 18 d继代1次, 从第5代开始连续测定3代愈伤组织的生长指数、状态、银杏内酯B含量。

1.3 胁迫法选育高产银杏内酯悬浮细胞系: 选育流程如下: 已6次继代的愈伤组织转入加玻璃珠的MS液体培养基, 培养5 d后捞出转入MS固体培养基, 每瓶植板20个左右的小细胞团, 培养10 d后加玻璃纸密封, 培养5 d后挑出存活的细胞团转入新的MS固体培养基进行增殖培养, 培养过程中挑出与细胞团颜色结构不一致的细胞, 继代4次后, 转入

MS液体培养基进行驯化培养, 形成分散性良好的银杏悬浮细胞系——测银杏内酯B含量并与愈伤组织中的含量进行比较。

1.4 愈伤组织和细胞生长参数的测定: 以干重为生长指标, 结果为5个平行试样的平均值, 生长指数 = (收获细胞量 - 接种细胞量) / 接种细胞量

1.5 HPLC测银杏内酯B含量: 取5 g左右的银杏干燥细胞, 用50%的乙醇抽提2次, 共1 h, 定容至100 mL, 用石油醚脱脂4次, 用乙酸乙酯萃取5次, 合并乙酸乙酯萃取液, 减压浓缩蒸干, 残渣用2%二甲亚砜-甲醇在温热条件下溶解, HPLC测定方法参照文献^[6]。

2 结果与讨论

2.1 培养基和外植体对愈伤组织生长和银杏内酯B含量的影响: 当外植体根、茎、叶接种于附加3 mg/L 2,4-D和0.5 mg/L KT的MS培养基上, 诱导愈伤组织后, 分别在MS培养基上继代5次。根、茎的愈伤组织诱导率高, 生长速度较快, 而叶片的愈伤组织诱导率低, 愈伤组织其组织结构较松软、黄白色, 生长缓慢, 从第5代开始生长势转弱, 开始出现黑色坏死。因此只选择根、茎诱导的愈伤组织分别接种在MS Bs White SH培养基上, 连续继代5次, 每次周期18 d, 结果如表1。培养基的不同影响愈伤组织的生长和银杏内酯B的合成: White培养基既不利于愈伤组织的生长, 使愈伤组织结块变硬, 生长缓慢, 又不利于银杏内酯的合成, 愈伤组织中银杏内酯含量低; MS培养基有利于形成分散性良好, 结构松软的愈伤组织, 但银杏内酯的含量低; Bs SH培养基上愈伤组织生长较快, 且对银杏内酯的合成有利, 但结构较致密, 分散性不好。不同来源的愈伤组织其生长速度和银杏内酯B的含量有差异, 来源于根的愈伤组织中银杏内酯含量高于来源于茎的愈伤组织, 不同品种间愈伤组织的生长速度和银杏内酯含量有差异。愈伤组织的结构与状态影响银杏内酯的含量, 愈伤组织结构松软、分散性好, 不利于银杏内酯的合成, 因此在培养过程中控制培养物的生长状态能促进银杏内酯的合成。愈伤组织在继代过程中其生长速度和银杏内酯含量不稳定, 变异系数(代与

代之间的差异程度: $s(\bar{x})$ 为 0.04~0.21,愈伤组织在生长特性、银杏内酯 B合成的差异及在继代过程中的不稳定性有利于选择出生长速度快、银杏内酯含量高的悬浮细胞系。因为外植体细胞在诱导培养

条件下脱分化形成具有分生能力的薄壁细胞,在这个过程中容易产生突变细胞,通过定向增加选择压能提高突变率和挑选出适应选择压的细胞系。

2.2 悬浮细胞系的生长特性和银杏内酯 B合成能

表 1 培养基对愈伤组织生长和银杏内酯合成的影响

培养基	品种	外植体	生长指数	指数变异系数 (s/\bar{x})	银杏内酯 B含量 ($\mu\text{g/g}$)	含量变异系数 (s/\bar{x})
MS	桐子果	茎	3.51	0.11	70±7.7	0.11
		根	3.11	0.07	110±19.8	0.18
	梅核 1号	茎	3.05	0.15	60±4.2	0.07
		根	2.86	0.14	110±13.2	0.12
	小佛手	茎	3.08	0.08	70±10.5	0.15
		根	3.26	0.13	120±19.2	0.16
B ₅	桐子果	茎	3.36	0.08	130±7.8	0.06
		根	2.86	0.14	190±20.9	0.11
	梅核 1号	茎	2.83	0.12	190±26.6	0.14
		根	3.06	0.07	250±52.5	0.21
	小佛手	茎	3.16	0.14	170±20.4	0.12
		根	3.01	0.13	210±39.9	0.19
SH	桐子果	茎	3.20	0.11	140±21.0	0.15
		根	2.95	0.09	190±22.8	0.12
	梅核 1号	茎	3.02	0.13	150±10.5	0.07
		根	2.78	0.06	210±25.2	0.12
	小佛手	茎	2.86	0.14	180±18.0	0.10
		根	2.56	0.12	250±37.5	0.15
White	桐子果	茎	1.85	0.07	30±3.3	0.11
		根	1.63	0.12	70±10.5	0.15
	梅核 1号	茎	1.55	0.04	40±3.2	0.08
		根	1.68	0.06	60±6.0	0.10
	小佛手	茎	1.64	0.04	60±8.4	0.14
		根	1.73	0.08	80±8.8	0.11

力比较:由于幼根诱导的愈伤组织银杏内酯合成能力高于幼茎诱导的愈伤组织,而在 B₅ White SH培养基上连续继代培养的愈伤组织结构致密,分散性差,不能用于选育悬浮细胞系,因此选择在 MS培养基上继代培养的幼根诱导的愈伤组织,按缺氧胁迫小细胞团法选育悬浮细胞系,对选出的细胞系进行 8代次的扩大和驯化培养,淘汰生长慢的细胞系,共选出 7个细胞系,其中桐子果 2个、梅核 3个、小佛手 2个,分别命名为 TZG-1 TZG-2 MH-1 MH-2 MH-3 XFS-1, XFS-2,它们的生长特性、银杏内酯含量如表 2。选择效益是指选出的悬浮细胞系在生

长特性和银杏内酯含量等方面比原来愈伤组织的提高程度,计算公式为选择效益 (%) = 100 × (悬浮细胞系值 - 愈伤组织值) / 愈伤组织值。从表 2看出,选出的悬浮细胞系细胞的生长速度比原来的愈伤组织提高幅度不大,最好的细胞系 MH-1也 只比原来的愈伤组织提高 35.7%,但银杏内酯的合成能力显著提高, MH-3中的银杏内酯含量在培养周期结束时比原来的愈伤组织提高了 172.7%,达到细胞干重的 0.03%,因此缺氧胁迫小细胞团法是一种有效的选育高产银杏内酯悬浮细胞系方法。

2.3 细胞系悬浮培养细胞生长和银杏内酯合成动

表 2 银杏悬浮细胞系与愈伤组织的生长特性和银杏内酯 B(GB)含量比较

项目	TZG-1	TZG-2	MH-1	MH-2	MH-3	XFS-1	XFS-2
细胞系生长指数	3.52	4.13	3.88	3.02	3.71	3.78	3.34
愈伤组织生长指数	3.11	3.11	2.86	2.86	2.86	3.26	3.26
生长指数选择效益	13.2	32.8	35.7	5.6	29.8	16.0	2.5
细胞系 GB含量 ($\mu\text{g/gDW}$)	250±18.5	210±25.6	280±41.5	190±20.9	302±3.6	230±25.3	210±18.9
愈伤组织 GB含量 ($\mu\text{g/gDW}$)	110±19.8	110±19.8	110±13.2	110±13.2	110±13.2	120±18.5	120±19.2
GB含量选择效益 (%)	127.1	90.9	154.5	72.7	172.7	91.7	75.0

力学研究:在选出的银杏细胞系中, MH-3的银杏内酯生产能力最强,在后续的研究中以此为实验材料, MH-3生长和银杏内酯积累的动力学研究结果如图

1 结果表明细胞接种后经过 6 d左右的缓慢生长期,随即生长明显加快,生物量显著增加,在第 18天时生物量达到最大,细胞干重为 15.3 g/L,比细胞

接种量增加了 3.65 倍。接着是细胞的缓慢生长期, 细胞在这一时期生物量略有下降。细胞中 GKB 的含量在接种后的 3~6 d 略有下降, 12~18 d 是银杏内酯的快速积累期, 第 18 天细胞中的银杏内酯含量最高, 达到 $302 \mu\text{g/g DW}$, 之后至第 21 天含量略有下降。因此在以后的研究中, 细胞的收获期不超过 20 d

2.4 继代悬浮培养过程中银杏内酯 B 合成稳定性研究: 在悬浮培养过程中, 很多植物细胞由于形态分化受到抑制和染色体发生变异, 使目的产物含量降低甚至消失, 如红豆杉中的紫杉醇, 随着继代次数的增加, 紫杉醇的含量迅速降低, 因而建立具有高而稳定的目的产物的细胞系是实现细胞大规模培养生产次生代谢物的关键之一。我们对细胞系 MH-3 进行了连续 6 代的继代培养, 结果如表 3 在继代培养过

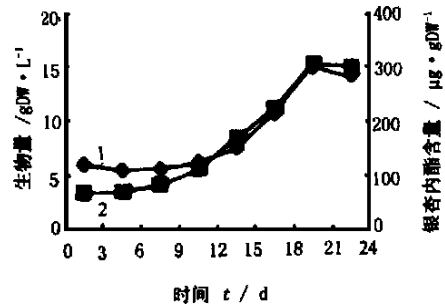
表 3 细胞系 MH-3 继代培养的稳定性的稳定性

继代次数	1	2	3	4	5	6	平均值 X	变异系数 (s/\bar{x})
生长指数	3.68	4.16	3.46	3.78	4.01	3.52	3.77	0.073
GB 含量 ($\mu\text{g/g DW}$)	340 ± 45.2	260 ± 31.2	280 ± 22.4	310 ± 34.3	320 ± 48.0	240 ± 26.4	293 ± 38.1	0.131

产银杏内酯细胞系取得明显效果, 选出的细胞系生产银杏内酯 B 的能力比原来的愈伤组织有了显著提高, 且其生产能力在继代过程中表现稳定, 在细胞悬浮培养过程中银杏内酯合成代谢的优化控制将另文报道。这些研究为今后实现银杏细胞大规模培养生产银杏内酯打下了良好基础

参考文献:

- [1] 冯汉林, 郑意端. 银杏苦内酯 B 及其同系物的药理作用 [J]. 中草药, 1997, 28(12): 725-755.
- [2] Corey E J, Kang M C, Desai M C, et al. Total syntheses of (\pm)-ginkgolide B [J]. JAM Chem Soc, 1988, 110(2): 649-



1-银杏内酯 B 2-生物量

图 1 悬浮培养时细胞生长和银杏内酯合成时间进程

程中, 细胞的生长指数和银杏内酯含量没有随继代次数的增加而明显下降, 其变异系数分别为 0.073 和 0.131, 性状表现稳定

采用缺氧胁迫小细胞团法从愈伤组织中选育高

651.

- [3] Carrier D J, Cosentino G, Neufeld R, et al. Nutritional and hormonal requirements of *Ginkg biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture [J]. Plant Cell Report, 1990, 8: 635-638.
- [4] 戴均贵, 朱蔚华, 吴蕴祺, 等. 不同培养基、激素、碳源和氮源对银杏愈伤组织生长及银杏内酯 B 形成的影响 [J]. 中草药, 1998, 29(增刊): 63-66.
- [5] 于荣敏, 赵鸿莲, 张辉, 等. 银杏细胞悬浮培养及其银杏内酯产生的研究 [J]. 生物工程学报, 1999, 15(2): 207-210.
- [6] 虞杏英, 庄向平, Braquet P, 等. 高效液相色谱分析银杏叶中的银杏内酯 B [J]. 药物分析, 1993, 13(2): 85-87.

5S-rRNA 基因间区序列变异用于金银花药材道地性研究初探

李萍, 蔡朝晖, 邢俊波*

(中国药科大学 生药学教研室, 江苏 南京 210038)

摘要: 目的 研究金银花药材道地性形成的基因基础。方法 用 SDS 法提取金银花 *Lonicera japonica* 不同居群、外类群细毡毛忍冬 *L. similis* 和山银花 *L. confusa* 的总 DNA, 进行 5S-rRNA 基因间区的 PCR 扩增和测序, 并用软件 Mega 进行分析。结果 *Lonicera* L. 属植物 5S-rRNA 基因间区约 210 bp, 其中 G+C 含量较高, 达 70% 左右, 不同居群的 *L. japonica* 碱基序列有差别, 通过测序可以进行鉴别。 *L. confusa* 与 *L. japonica* 间的遗传距离较大。结论 种间 5S-rRNA 基因间区的序列差异大于种内; 道地药材之间的遗传距离较小; 道地与非道地药材之间的遗传距

* 收稿日期: 2000-12-04

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (39730500), 教育部优秀教师资助计划项目, 江苏省“333”工程项目资助

作者简介: 李萍 (1960-), 女, 辽宁大连人, 教授, 博士生导师, 理学博士, 国家有突出贡献的中青年专家。1982 年毕业于辽宁中医学院中药系, 1988 年毕业于中国药科大学生药学专业, 获得博士学位。1992 年任副教授, 1995 年破格晋升为教授。主要研究方向: 中药药材的品种鉴定、质量评价及活性成分研究。Tel: (025) 5322256 Fax: 025-5322448 E-mail: lipingl@publicl.ptt.js.cn