

沈小钟,莫小路,曾庆钱,等. TDZ 对银杏悬浮细胞生长及次生代谢物的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):48-51.

TDZ 对银杏悬浮细胞生长及次生代谢物的影响

沈小钟^{1,2}, 莫小路¹, 曾庆钱¹, 张现涛¹

(1. 广东食品药品职业学院, 广东广州 510520; 2. 暨南大学药学院, 广东广州 510632)

摘要:为了考察苯基噻二唑基脲(TDZ)对银杏悬浮细胞生长及次生代谢物的影响,将不同浓度 TDZ 加入悬浮培养体系中检测悬浮细胞生长率及次生代谢物质。结果表明,TDZ 浓度低于 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 时对银杏悬浮细胞生长率的影响呈先增大后减小的趋势;在悬浮体系中加入 0.1 $\mu\text{mol/L}$ TDZ 能促进细胞二萜类化合物的生成,银杏内酯 B 干重含量达到 0.008 3% ~ 0.010 7%。表明一定浓度的 TDZ 对银杏悬浮细胞生长和银杏内酯的生成有促进作用。

关键词:银杏内酯;细胞悬浮培养;TDZ

中图分类号:Q943.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)11-0048-04

银杏(*Ginkgo biloba* L.)别称白果树,是著名的孑遗植物。银杏叶含有多药用次生代谢产物。以银杏黄酮和银杏内酯混合物为主要药用活性成分的银杏叶提取物为《中国药典》和《欧洲药典》所收载,在全球已有多年的临床运用历史,其制剂被广泛用作预防和治疗缺血性心脑血管疾病^[1],自 20 世纪 90 年代起,银杏制剂一直是治疗心脑血管疾病的首选天然药物。现有工业化生产获得银杏活性成分的方法大多是从银杏叶中提取^[2-7]。已有研究发现,树龄是影响银杏叶中活性成分黄酮和内酯类含量的主要因素^[8],树龄为 3 年的银杏叶中银杏黄酮含量最高,树龄超过 5 年后银杏叶黄酮含量和内酯含量随着树龄的增大显著下降^[9-10]。另外天然资源的获得既受到地区、季节、产量等限制,又大量占有用地;而细胞悬浮培养生产银杏活性成分具有生长条件可控、周期短、产量大等优点,既保护了珍贵的药材资源,又满足了人们对银杏产品的大量需求。苯基噻二唑基脲(thidiazuron, TDZ)是一种人工合成的植物生长调节剂,已被证实可同时起到细胞分裂素和生长素的作用^[11],将 TDZ 应用于银杏悬浮细胞的研究仅见 1 篇有关黄酮的报道^[12]。本研究采用 TDZ 与植物激素联合应用作为生长调节剂对银杏悬浮细胞进行继代培养,并初步探讨了 TDZ 对银杏悬浮细胞生长特性和次生代谢物的影响,以期对银杏产品的深入开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

以银杏种胚为外植体,诱导愈伤组织继代培养,筛选多次

继代培养后生长旺盛的愈伤组织转移至液体培养基进行悬浮培养,多次继代后获得稳定的液体培养体系。

1.2 方法

1.2.1 银杏愈伤诱导与继代培养 (1)愈伤诱导培养:MS 培养基 + 3 mg/L NAA + 5 mg/L KT + 30 g/L 蔗糖 + 6.5 g/L 琼脂粉,将 pH 值调为 5.8,120 $^{\circ}\text{C}$ 高压湿热灭菌 20 min,将银杏种胚接种到固体培养基中 21 ~ 28 d 诱导愈伤组织。(2)愈伤继代培养:筛选生长力旺盛的愈伤组织,接种到继代培养基继代生长,继代培养基中 KT 浓度为 2 mg/L,其他条件与诱导培养基相同,继代间隔时间为 21 ~ 28 d。

1.2.2 银杏细胞悬浮培养与继代培养 悬浮培养及继代培养基:MS 培养基 + 3 mg/L NAA + 2 mg/L KT + 30 g/L 蔗糖,将 pH 值调为 5.8,120 $^{\circ}\text{C}$ 高压湿热灭菌 20 min。将生长力旺盛的愈伤组织细胞接种到悬浮培养基中悬浮培养和继代培养,继代周期为 18 ~ 21 d,光照 1 500 ~ 2 000 lx,转速 120 r/min,鲜重接种量为 20 ~ 30 g/L 培养基。

1.2.3 TDZ 对银杏悬浮细胞生长的影响 考察不同浓度(0.05、0.1、0.15、0.2 $\mu\text{mol/L}$)TDZ 对银杏细胞悬浮培养的影响,计算生长率。培养前测定接种悬浮细胞重量(先测定培养瓶重量,再测定接种悬浮细胞后的培养瓶重量,二者相减),培养后测定收获悬浮细胞重量(先测定培养瓶总重量,再测定去除悬浮细胞的培养瓶重量,二者相减)。悬浮培养细胞重量的测定:取悬浮培养细胞过 400 目滤网,蒸馏水清洗,滤纸吸取水分,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥至恒重,称重。生长率计算公式:生长率 = (收获悬浮细胞重量 - 接种悬浮细胞重量) / 接种悬浮细胞重量。

1.2.4 银杏悬浮细胞二萜类化合物的测定 提取方法:取银杏悬浮细胞烘干,称 15 g 装入用定性滤纸制作的圆柱状筒中,置于索氏提取器中,加 150 mL 甲醇热回流 3 h,提取液回收甲醇,加入石油醚萃取,弃去石油醚部分,母液加入乙酸乙酯萃取,萃取液回收乙酸乙酯,样品加甲醇定容至 10 mL,即得银杏悬浮细胞;采用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,注入 HPLC 分析仪定量。

1.2.4.1 银杏内酯含量检测 HPLC-ELSD/DAD 法测定银杏内酯含量。色谱条件:色谱柱以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(5 μm , 4.6 mm \times 250 mm, Phenomenex 110A),柱温为

收稿日期:2013-05-07

基金项目:广东省科技计划(编号:2009A030901011);广东省自然科学基金(编号:S2011010001294);广东省广州市珠江新星科技计划(编号:2011J220012);广东食品药品职业学院科研资助项目(编号:2010YZ002)。

作者简介:沈小钟(1981—),男,江苏东台人,硕士研究生,主管药师,实验师,主要从事中药生物技术及食品药品质量研究。Tel:(020)28854995;E-mail:xzhshen@gmail.com。

通信作者:莫小路,博士,教授,主要从事中药资源学研究。Tel:(020)28854883;E-mail:moxl@gdzy.edu.cn。

35 ℃, 漂移管温度为 80 ℃, 气体流速为 2 L/min, 流动相比比例为水: 甲醇 = 64: 36。用外标法以峰面积定量: 共进样 3 次, 根据标准曲线公式计算出样品中银杏内酯 B 浓度, 再由提取液体积及样品重量求得样品中银杏内酯 B 的百分含量。银杏内酯 B 的含量基于干重测定。

1.2.4.2 HPLC-ELSD 方法学试验 线性关系: 称取银杏内酯 B 对照品 50 mg, 置于 20 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶液定容至刻度, 摇匀, 作为母液。分别从母液中移 0.2、1、2、5 mL 置于 4 个 10 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 移取各供试液 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。溶液稳定性试验: 取标准曲线项下供试液 3, 分别于 0、2、4、6、8 h 进样, 记录峰面积, 并计算平均值和相对标准偏差。

1.2.4.3 HPLC-DAD 方法学试验 精密度试验: 取标准曲线项下供试液 3, 连续进样 6 次, 计算峰面积值相对标准偏差。线性关系: 取银杏内酯 B 对照品约 100 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为母液。量取母液 1、2、4、5 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为各浓度梯度的供试液。移取供试液 20 μL 注入液相色谱

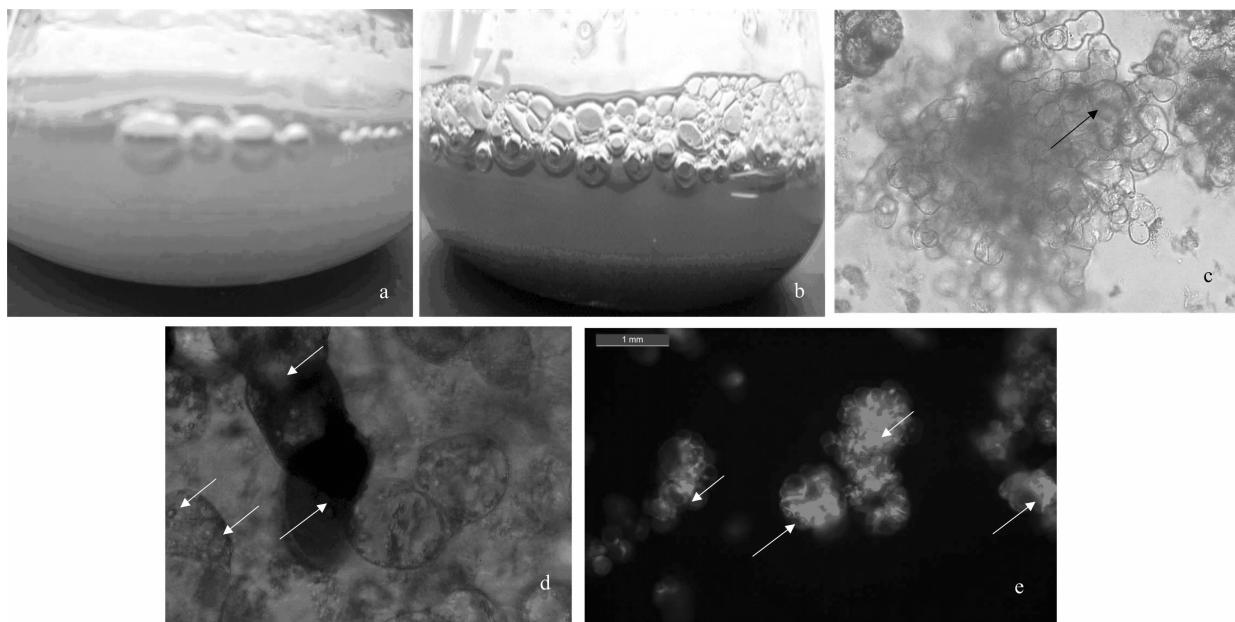
仪, 记录色谱图。溶液稳定性试验: 取标准曲线项下供试液 3, 分别于 0、2、4、6、8 h 进样, 记录峰面积, 并计算平均值和相对标准偏差。精密度试验: 取标准曲线项下供试液 3, 连续进样 6 次, 计算峰面积值相对标准偏差。

2 结果与分析

2.1 TDZ 对银杏悬浮细胞生长的影响

20 世纪 80 年代初有学者证明 TDZ 具有类似细胞分裂素的活性^[13]。本研究主要将 TDZ 与其他天然植物生长激素组合应用, Visser 最先发现 TDZ 在培养天竺葵组织时, 可以同时具有生长素和细胞分裂素的作用^[14]。TDZ 联合其他激素用于植物悬浮培养的研究鲜见报道。本研究表明, TDZ 在银杏组织培养中可同时发挥传统生长素和细胞分裂素的作用, 保持悬浮细胞旺盛生长。

图 1 显示了 TDZ 和 CK 条件下培养银杏悬浮细胞的肉眼观察状态和显微状态; 图 2 显示了不同浓度 TDZ 对银杏细胞悬浮培养物性状和生长率的影响。



a. CK; b. 0.1 μmol/L TDZ; c、d、e 为银杏细胞显微结构 (100×), c 为 CK, d、e 为 0.1 μmol/L TDZ, 箭头所指为叶绿体

图 1 不同激素条件下银杏悬浮培养物状态

银杏悬浮细胞继代培养时随着 TDZ 浓度增大其生长率逐渐增高, 在 TDZ 浓度为 0.1 μmol/L 时达到最高值 (4.88 ± 0.42), 高于对照的生长率 (4.36 ± 0.27), 但 TDZ 浓度超过 0.1 μmol/L 时, 其生长率反而降低 (图 3、表 1)。

2.2 TDZ 对银杏悬浮细胞二萜内酯含量的影响

在 HPLC-ELSD 方法线性关系方面, 以进样量的对数 lgM 为横坐标, 峰面积的对数 lgA 为纵坐标, 得回归方程: $y = 1.3968x + 1.7693$, $r^2 = 0.9997$ 。银杏内酯 B 在进样量为 1.01 ~ 50.12 μg 时呈良好的线性关系。

在 HPLC-DAD 方法线性关系方面, 回归方程为: $y = 25.878x - 11.346$, $r^2 = 0.9999$ 。银杏内酯 B 在进样量为 10.01 ~ 100.12 μg 时呈良好线性。

在稳定性试验方面, HPLC-ELSD 方法的 RSD 值为

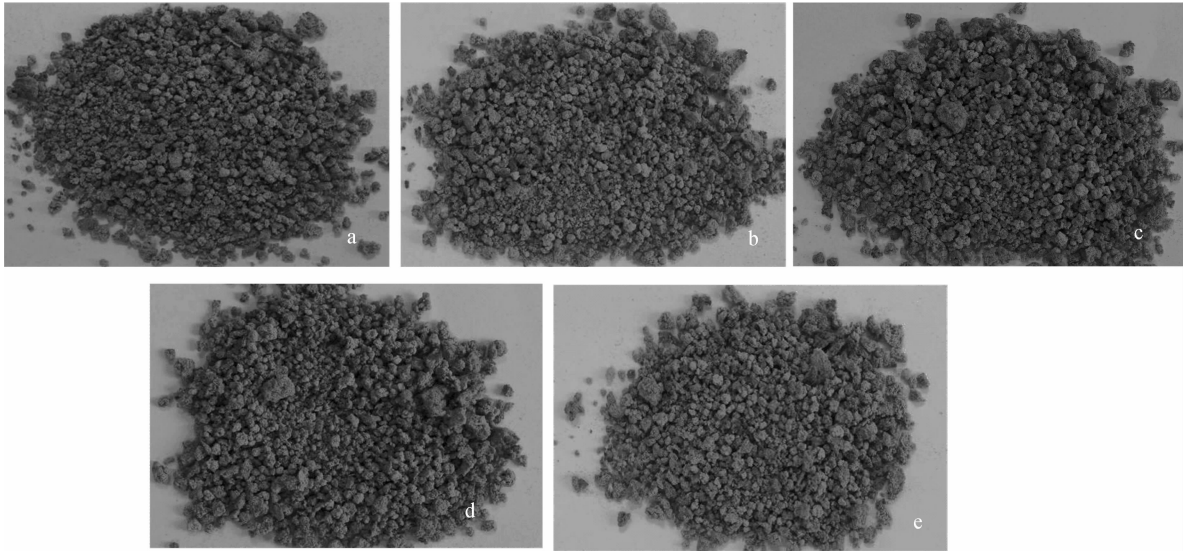
1.01%, HPLC-DAD 方法的 RSD 值为 1.21%。在精密度试验方面, HPLC-ELSD 方法的 RSD 值为 1.47%, HPLC-DAD 方法的 RSD 值为 0.66%。

由图 4 可见, 在 CK 培养体系中收获的银杏悬浮细胞提取物中未能检测到银杏内酯存在。

由图 5 可见, 在培养基中加入 0.1 μmol/L TDZ 组合植物激素对银杏内酯含量产生影响, 含有 TDZ 的悬浮培养体系可增加银杏内酯的积累, 银杏内酯 B 干重含量达到 0.0083% ~ 0.0107%。

3 结论与讨论

TDZ 是强细胞分裂素。本研究表明, 在 MS、NAA、KT 组成的悬浮培养基中加入 TDZ, 银杏悬浮细胞生长率略有增加,



悬浮体系为MS培养基+3 mg/L NAA + 2 mg/L KT +30 g/L蔗糖+TDZ, 将pH值调为5.8;
a. CK; b. 0.05 $\mu\text{mol/L}$ TDZ; c. 0.1 $\mu\text{mol/L}$ TDZ; d. 0.15 $\mu\text{mol/L}$ TDZ; e. 0.2 $\mu\text{mol/L}$ TDZ
图2 不同浓度TDZ对银杏细胞悬浮培养的影响

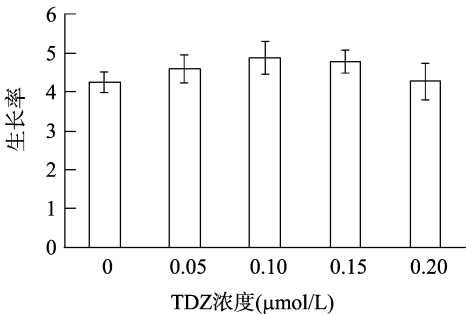


图3 TDZ浓度对银杏细胞悬浮生长的影响

表1 6-BA 与 TDZ 培养对银杏细胞悬浮培养的影响

TDZ 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	色泽
0 (CK)	黄绿 +
0.05	绿色 +++++
0.10	绿色 +++++
0.15	绿色 +++
0.20	绿色 ++

注:“+”“++”“+++”“++++”“+++++”分别表示颜色由浅至深不断增加。

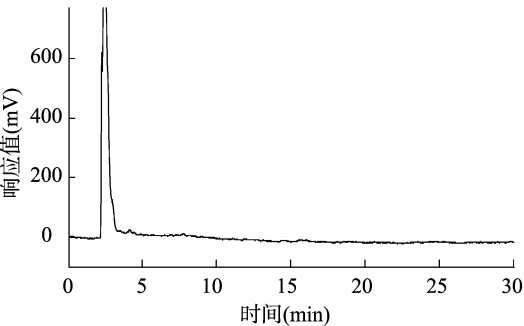


图4 CK培养体系中银杏悬浮细胞次生代谢产物检测

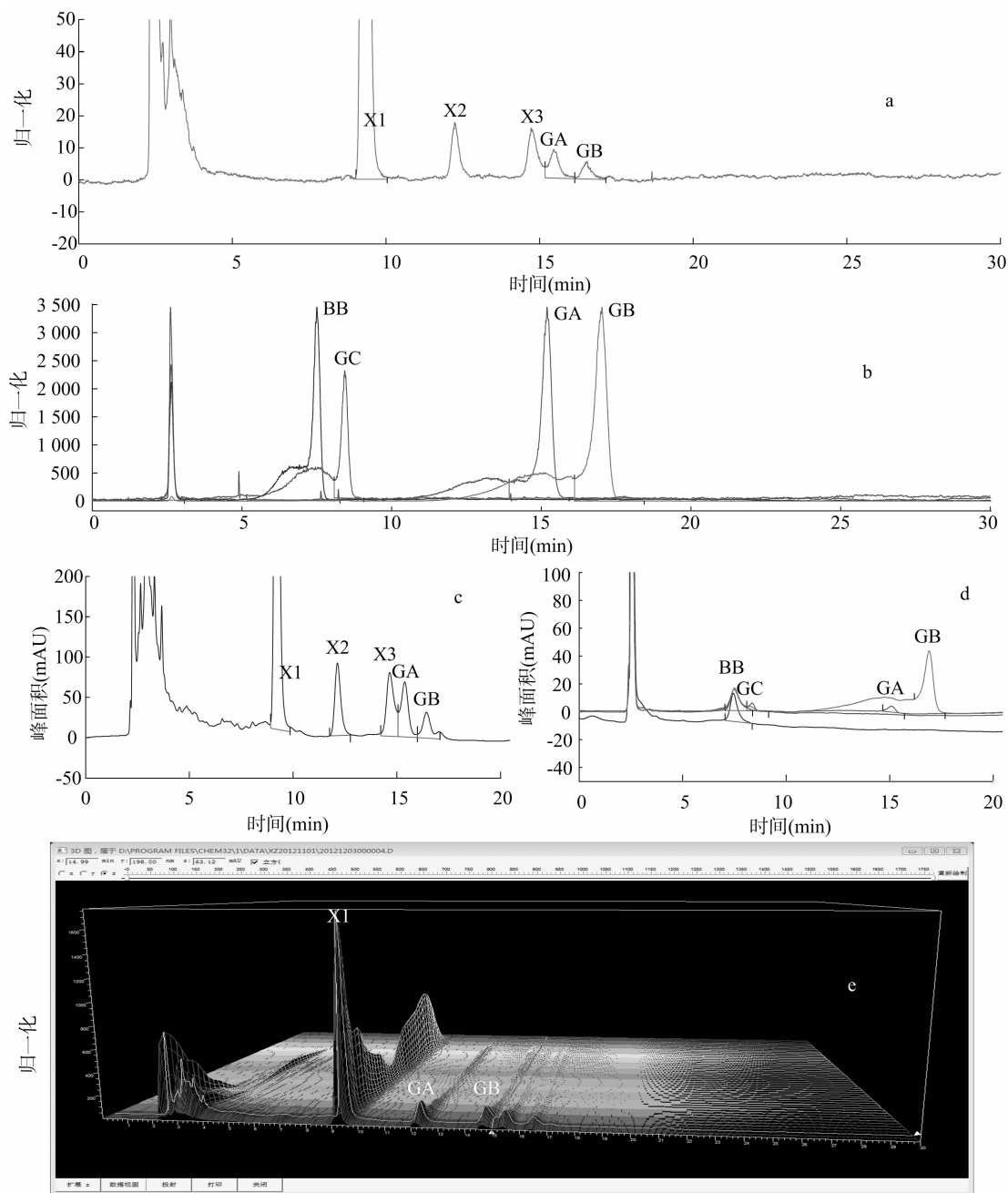
TDZ 促进了银杏悬浮培养细胞中二萜类化合物的生成,银杏内酯 B 干重含量达到 0.008 3% ~ 0.010 7%。表明 TDZ 在银

杏细胞悬浮培养中同时发挥着传统生长素和细胞分裂素的作用。本研究以银杏种胚直接诱导愈伤组织,继而进行细胞悬浮培养研究,并在悬浮细胞中检测到银杏内酯存在,该结果可为银杏悬浮培养增加药用活性成分提供一种方法。

本研究建立了 HPLC - ELSD 和 HPLC - DAD 2 种方法测定银杏内酯 B 含量,2 种方法各有优势。ELSD 是一种通用型检测器,其原理是当洗脱液从色谱柱流出、进入雾化器后,即与气体(高纯空气或氮气)混合,然后一起通过热飘移管,流动相被蒸发,接着强光或激光经过样品组分产生散射,最后通过光电二极管接收检测散射光。ELSD 不依赖样品的光学性质,与 DAD 检测方法比,ELSD 检测器响应的成分较多,该方法高效、不受化合物是否有紫外吸收影响,但灵敏度和稳定性较 DAD 低,因此本研究在检测时同时建立了 HPLC - DAD 检测银杏内酯的方法以弥补 ELSD 的不足。

参考文献:

[1] Müller W E, Heiser J, Leuner K. Effects of the standardized *Ginkgo biloba* extract EGb 761® on neuroplasticity [J]. International Psychogeriatrics, 2012, 24 (S1): S21 - S24.
[2] 陆敏强, 黄辉庆, 李瑞明. 银杏叶中银杏总内酯提取工艺研究 [J]. 中国医药导报, 2010, 7 (23): 72 - 73.
[3] 邱俊明, 余 宙, 邱祖民. 银杏内酯 B 提取分离技术的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2010 (12): 1042 - 1044.
[4] 杨港坚, 冯达星. 银杏总内酯提取工艺研究 [J]. 中国医药导报, 2010, 7 (11): 54 - 55.
[5] 戴余军, 卢 莲, 李长春, 等. 银杏叶多糖提取工艺正交试验优化 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40 (12): 306 - 307.
[6] 陈 冲, 王文丰, 孙来九. 从银杏叶中提取银杏黄酮的最佳工艺条件研究 [J]. 精细化工, 1997 (6): 21 - 24.
[7] 姚渭溪. 银杏叶中活性成分的提取工艺、测定及其进展 [J]. 中草药, 1995 (3): 157 - 159.
[8] 陈学森, 章文才, 邓秀新. 树龄及季节对银杏叶黄酮与萜内酯含量的影响 [J]. 果树科学, 1997 (4): 226 - 229.



a. 培养体系ELSD图; b. 银杏内酯对照ELSD色谱图; c. 培养体系205 nm图; d. 银杏内酯对照205 nm色谱图; e. 培养体系3D全波长扫描图; BB为白果内酯, GC为银杏内酯C, GA为银杏内酯A, GB为银杏内酯B; 悬浮体系为MS培养基+3 mg/L NAA + 2 mg/L KT +30 g/L蔗糖+0.1 $\mu\text{mol/L}$ TDZ, pH值为5.8

图5 0.1 $\mu\text{mol/L}$ TDZ对培养体系中银杏内酯含量的影响

- [9] 王先荣,周正华,杜安全,等. 不同生长季节及生长年限银杏叶总萜内酯含量的相关性研究[J]. 中国药科大学学报,2000,31(2): 88-90.
- [10] van Beek T A, Lelyveld G P. Concentration of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves in relation to the time of year[J]. Planta Medica,1992,58(5):413-416.
- [11] Guo B, Abbasi B H, Zeb A, et al. Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(44):8984-9000.
- [12] 莫小路,黄学林,孟辰. 银杏悬浮细胞叶绿体的分化与黄酮类

产物积累[J]. 中山大学学报:自然科学版,2003,42(6):94-97.

- [13] Baskakov Y A, Shapovalov A A, Zhirmunskaya N M, et al. Interrelation between the growth-regulating activity and phytotoxicity of synthetic cytokinins[J]. Doklady Akademii Nauk SSSR, 1981, 257(6):1514-1516.
- [14] Visser C, Qureshi J A, Gill R, et al. Morphoregulatory role of thidiazuron substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures[J]. Plant physiology, 1992, 99(4):1704-1707.