

银杏细胞培养中影响黄酮积累量的几个因素

房建军¹, 阙国宁¹, 韩一凡²

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要:以幼苗茎段为外植体建立了生长黄酮的悬浮细胞培养体系,对细胞生长周期、相应的黄酮积累量变化以及苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性进行了研究。结果表明,黄酮的积累在细胞生长对数期内增加,于15 d达最高峰。在黄酮积累的过程中PAL活性也呈增加趋势。当培养细胞转换新鲜培养基时,PAL活性增加了2倍(从0.05到0.15 OD)。用紫外线处理,培养于暗中细胞的PAL活性增加了11倍(从0.05到0.60 OD)。

关键词:银杏;黄酮;细胞培养;苯丙氨酸解氨酶;紫外光(UV)

中图分类号:S792.95 **文献标识码:**A

Several Factors Affecting Accumulation of Flavonoids in Suspension-cultured Cells of *Ginkgo biloba*

FANG Jian-jun¹, QUE Guo-ning¹, HAN Yi-fan²

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China; 2. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: The cell suspension culture system was established for producing flavonoids by using stem of young seedling as explants. A study was made on the phase of cell growth and relative changing amount of flavonoids, as well as the activity of L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (EC 4.3.1.5). It was showed that the flavonoids accumulation increased in the exponential phase of cell growth, and reached the highest on the 15th day after culture. The activity of PAL increased during this period. PAL activity doubled in response to transferring suspension-cultured cells into new medium. In cell suspension cultures, growth in the dark, but not in light-growth cultures, PAL activity was induced up to 12 times by UV-light.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; flavonoids; cell culture; phenylalanine ammonia-lyase (PAL); UV-light

银杏(*Ginkgo biloba* L.)叶提取物中含有两类重要的生理活性物质——黄酮类化合物和萜内酯,这些物质具有治疗和预防心脑血管疾病的能力,可用于开发药品、保健食品和化妆品,现世界上已公认是治疗动脉硬化最有效的药物之一,银杏提取物占有的市场份额排名均属植物药前5位^[1]。离体条件下研究植物次生物质的规律是常用的研究手段,也是细胞工程的前期工作,作者试图以细胞培养的方式研究银杏黄酮的积累情况,研究影响黄酮积累的几个因素。目前,这一领域的研究已涉及400余种

植物,600多种物质,紫草(*Onosma paniculatum* Bur. et Franch.)、人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)、黄连(*Coptis japonica* (Thunb.) Makino.)、毛地黄(*Digitalis purpurea* L.)和长春花(*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)等植物的提取物已实现工业化生产^[2];但对于多数物质的研究尚处于前期工作,对次生代谢物形成的营养条件和光温气热等物理条件都所知不多,尚不能用于工业化生产。发达国家如日本、德国、韩国等已对生物反应器内的微环境作出了很多研究,研究与应用均走在世界前列^[2]。我国虽然有植物资

收稿日期:1999-10-22 修回日期:2005-09-06

基金项目:1996年林业部重点实验室基金:银杏离体培养与黄酮积累

作者简介:房建军(1968—),男,内蒙古宁城县人,博士

源优势,但此类研究亟待提高。总之这是一个具有潜在价值的研究领域,也是植物生物技术的一个重要组成部分,越来越引起人们重视。

1 材料与方 法

(1) 愈伤组织的获得 培养基与外植体等详细内容见参考文献[3]。外植体为幼苗茎段,培养于 $MS + NAA 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + KT 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值 5.7 的培养基中,分光暗两种培养条件

(2) 细胞悬浮培养 筛选愈伤组织并进行悬浮培养,接种量约 1% (V/V),采用摇瓶培养,基本培养基为 $MS + NAA 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + KT 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 值 5.8; 恒温摇床转速 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 振幅为 2.0 cm; 温度设为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 光照 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$; 每瓶培养液 150 mL。细胞生长用生物量作为指标,培养一定时间后细胞悬浮液过滤,所得细胞于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 下烘干至恒质量^[3~5]。

(3) 紫外光照射 将 10 mL 培养 3 个周期的细胞转入直径 9 cm 的已灭菌的培养皿中,用波长为 300 nm 的紫外光分别照射 10、15、20 min.,再培养 1、2、3、4、5 d 后测定 PAL 的活性。

(4) 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定 在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下,将处于对数生长期的 200 mg 细胞加入 2 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸缓冲液(pH = 8.8, 内含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 巯基乙醇),冰浴研磨, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 上清液用作酶检测。检测反应: 1 mL 酶液加 3 mL $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的苯丙氨酸, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 60 min, 然后于紫外分光光度计 290 nm 波长下比色,测定光密度^[6]。

(5) 黄酮总量的测定 黄酮总量的测定采用 $AlCl_3$ 比色法^[3]。

2 结果与分析

2.1 细胞的生长周期与黄酮积累

经观测,细胞干质量的变化基本上呈一条“S”形曲线(图1),其干质量积累随着培养时间的变化而变化。生长滞后期约 10 d,在 0~10 d 内,细胞总量缓慢增加;在 10~15 d 内细胞增加的梯度较为明显,为快速生长期;15 d 后为生长稳定或衰老期。20 d 后细胞开始解体死亡,干质量开始减少,在此实验条件下,细胞生长周期约为 20 d。如需继代培养,要在第 15 d 左右转培养基。经过 25 d 的悬浮培养,每间隔 5 d 取样,测定细胞鲜干质量与总黄酮含量

的变化情况。从黄酮的积累量看,基本与生长呈正相关,即生长迅速的时候黄酮积累量也越多。

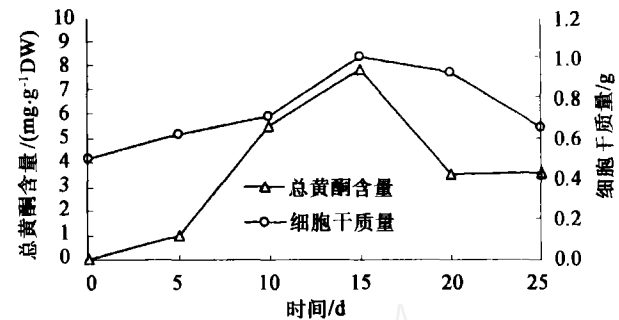


图1 细胞生长过程中干质量与黄酮积累的变化情况

谢启昆等^[7]的研究表明,培养细胞的生长与次生代谢物积累的关系大体上有 3 种类型:第 1 类,细胞生长与代谢产物呈平行关系,如烟碱、托品碱、葱酮等;第 2 类,细胞停止生长或死亡时代谢物产量最高,如多酚与紫草素;第 3 类,产物的产生曲线比细胞生长线推迟一些,如薯蓣皂甙元。从本实验的结果可看出,银杏的细胞培养基本上呈现出第 1 类,有人也称之为偶联关系,由此可反映初级代谢对次级代谢的主导作用。

2.2 细胞生长过程中 PAL 活性的变化

图 2 说明了整个培养过程中 PAL 活性的变化,在培养的一开始,可见 PAL 活性有一个短时间的升高,出现在转换到新的培养基上之后不久,在类似的研究中此类现象被称之为“稀释效应”^[8];于第 13 天时又有一个高峰,15 d 后酶活性逐渐下降。

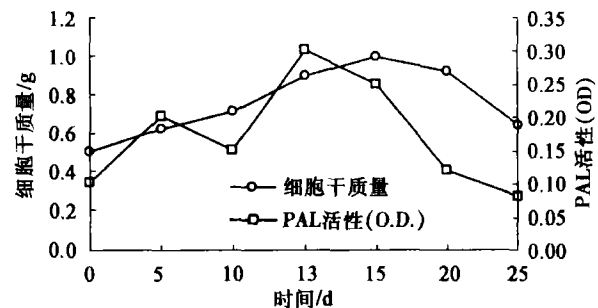


图2 细胞生长过程中 PAL 活性的变化

2.3 紫外光照射对 PAL 的影响

光是细胞培养过程中最重要的因素之一,不同波长的光会影响生物合成过程中酶的诱导。从图 3 可以看出,暗培养的细胞接受 UV 后,其 PAL 活性增加了,20 min 照射可引起 12 倍的瞬间升高,但光下培养的细胞则没有这种变化(图 4)。在对照中只看到了微弱的稀释效应。在很多报道中, PAL 活性增

强的最高峰在受到光、致伤、真菌侵害后的 24 h,但由于细胞的异质性,本实验中在继代后 1~3 d 均能看到这种变化。光暗两种细胞的不同表现可能是因为:在光下的细胞中已经积累了一定数量的次生代谢产物,产物抑制效应可能是一个主要原因。

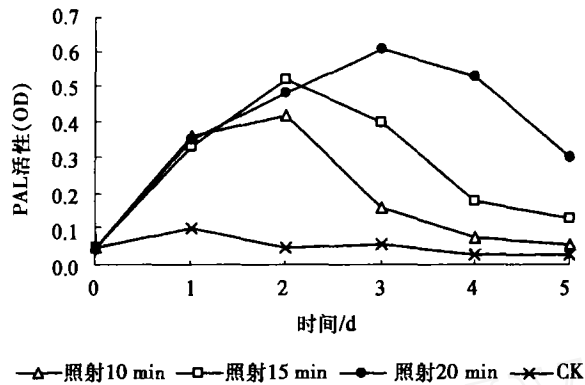


图3 UV对暗中培养细胞PAL活性的影响

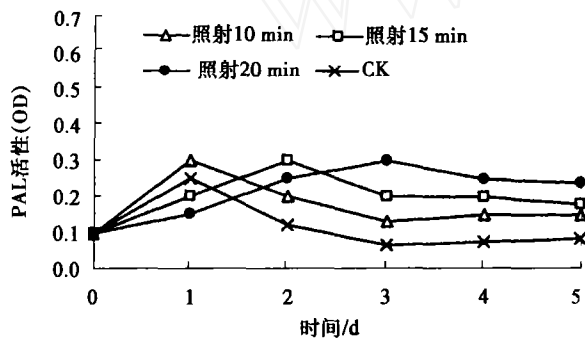


图4 UV对光下培养细胞PAL活性的影响

苯丙氨酸解氨酶(PAL, EC 4.3.1.5)催化L-苯丙氨酸直接脱氨产生反式肉桂酸,是苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶,它是连接初生代谢和苯丙烷类代谢的纽带,成为植物次生代谢中研究得最多的酶。PAL酶蛋白由4个亚基组成,编码PAL的基因是一个多基因家族,不同的基因可被不同的因素所诱导,如:机械损伤、真菌细胞壁诱导因子、各种类型的光等等,因此是诱导酶^[9]。实验结果表明,PAL活性的增加在第13天时达到最高值,而在此时细胞生长速率也达到最高,之后,酶的活性又开始下降,细胞生长速率也随之下降,而银杏黄酮的积累于15 d时达到顶峰,这说明银杏黄酮的积累之前先有一个酶的活性增加过程,而终产物的出现还存在滞后性。在紫外光照射培养于两种条件下细胞中PAL活性研究的结果耐人寻味。据报道^[10],受紫外光照射时细胞内大量积累类黄酮物质,以吸收紫外光;类黄酮物质的积累是查尔酮合

成酶(CHs)及一些基因在转录水平上活性提高的结果,这反应了在外界条件改变的情况下,各种调控因子综合作用所表现的结果,同时也反应了次生代谢物研究的复杂性。

3 讨论

国外有人作过旨在产生萜内酯的银杏细胞培养^[11],但含量很低,远不能达到工业化生产的要求。本文以幼苗茎段为材料,得到了分散性良好的愈伤组织,建立了悬浮培养体系,在研究方法上有了新的尝试,为以后的进一步工作开了个头。至于银杏培养细胞能否象紫草素一样进行工业化生产,尚有很多工作要做。本文的研究表明:银杏细胞中不但含有黄酮,而且初步分析其含量高于同等生长时间的植物材料,这为以后的研究提供了基础数据。

参考文献:

- [1] 张成文. 美国植物提取物最新动态与发展趋势[J]. 国外医药·植物药分册, 1999, 14(1): 1~4
- [2] Mulabagal V, Tsay H S. Plant Cell Cultures-An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites[J]. International Journal of Applied Science and Engineering, 2004, 2(1): 29~48
- [3] 房建军, 阙国宁. 银杏愈伤组织生长和黄酮类化合物积累的关系[J]. 林业科学研究, 1998, 11(2): 124~129
- [4] Carrier D J, Cosentino G, Neufeld R, et al. Nutritional and hormonal requirements of *Ginkgo biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture[J]. Plant Cell Reports, 1990, 8: 635~638
- [5] Jeon M H, Sang H S, Hoon H, et al. Cultures of *Ginkgo biloba*, effect of nutritional and hormonal factors on the growth of cultured cells derived from *Ginkgo biloba*[J]. Arch Pharmacol Res, 1993, 16(3): 244~250
- [6] 王敬文, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究[1]. 植物生理学报, 1981, 7(4): 373~380
- [7] 谢启昆, 刘涤, 丁家宜, 等. 药用植物组织培养[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986
- [8] Hahlbrok K. Regulation of phenylalanine ammonia-lyase activity in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. Apparent rates of enzyme synthesis and degradation[J]. Eur J Biochem, 1976, 63: 137~145
- [9] 欧阳光察, 薛应龙. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控[J]. 植物生理学通讯, 1988(3): 9~16
- [10] 朱玉贤, 李毅. 现代分子生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997
- [11] Carrier D J, Archambault J, Heijden R V. Formation of terpenoid products in *Ginkgo biloba* L. cultivated cells[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15(12): 888~891