

冬凌草根际土壤微生物抗肿瘤活性菌株筛选

高蓬明 (贵阳学院, 贵州贵阳 550005)

摘要 [目的] 为开发利用冬凌草根际土壤微生物资源。[方法] 使用 K562 细胞的 SRB 法筛选模型, 对从贵州省施秉县采集的冬凌草根际土壤样品中分离的 207 株微生物(放线菌 112 株、真菌 95 株)进行了抗肿瘤活性筛选。[结果] 得到活性菌株共 27 株, 阳性率为 13.0%, 其中真菌 13 株, 放线菌 14 株。[结论] 冬凌草根际土壤微生物是寻找抗肿瘤活性代谢产物的良好资源。

关键词 冬凌草; 根际土壤微生物; 抗肿瘤; 筛选

中图分类号 S154.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)25-10952-02

Screening of Antitumor Strains from Rhizosphere Soil Microorganisms from *Rabdosia rubescens*

GAO Peng ming (Guizhou College, Guiyang, Guizhou 550005)

Abstract [Objective] The research aimed to explore and utilize rhizosphere soil microorganisms resources. [Method] 207 strains of rhizosphere soil microorganisms, including 112 actinomycetes and 95 fungi, were isolated from *Rabdosia rubescens* in Sibing, Guizhou Province. And their fermented products were screened with K562 cells by SRB method. [Result] 27 strains showed cell proliferation inhibitory activity on K562 cells, which possessed 13.0% of total 207 strains tested. In the active strains, there were 14 actinomycetes and 13 fungi, respectively. [Conclusion] Rhizosphere soil microorganisms from *Rabdosia rubescens* were good resources for seeking antitumor metabolites.

Key words *Rabdosia rubescens*; Rhizosphere soil microorganisms; Antitumor; Screening

冬凌草 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara] 为唇形科香茶菜属植物, 广布于我国黄河、长江流域, 味甘苦, 性微寒, 具清热解毒、消炎止痛及抗肿瘤之功效^[1]。1972 年冬凌草在济源被发现并定名; 1977 年被收入《中华人民共和国药典》; 1991 年我国卫生部批准将其干燥叶及地上部分作为中药材, 收入部颁中药材标准。冬凌草对食管癌、贲门癌、乳腺癌、直肠癌、白血病等肿瘤具有抑制作用, 是一种有待进一步研究开发的抗肿瘤植物资源^[2]。冬凌草主要抗癌活性成分为冬凌草甲素、冬凌草乙素。近年来, 国内外学者对冬凌草及同属植物的生药、化学成分、药理作用、构效关系、临床应用、开发应用等进行了大量研究^[3], 但对其作为药用植物的相关微生物资源的研究尚未见报道。为开发利用该药材相关微生物资源, 笔者对贵州省施秉县冬凌草根际土壤微生物进行了抗肿瘤活性筛选, 分离得到 207 株冬凌草土壤根际微生物, 并对其发酵产物进行体外抗肿瘤活性筛选, 得到 27 株活性菌株, 为抗肿瘤活性化合物的进一步提取分离工作奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂 人慢性髓性白血病细胞 K562 购自中国科学院细胞库(上海); 胎牛血清(FBS)和 RPM-1640 细胞培养基分别为 Hydrex 公司和 Gibco 公司产品; 发酵采用的培养基成分均为市售分析纯试剂。

1.2 仪器 酶标仪为美国 Molecular Devices 公司 Versa max 型; 电动吸引机为上海医疗器械工业集团公司 YB-DX23B 型; 生化培养箱为上海跃进集团 SPX-250B 型; 摇床为上海福玛试验设备有限公司 QYG211 型; 超净工作台为苏净集团 SW-CJ-ZFD 型; CO₂ 细胞培养箱为日本三洋公司产品; 普通及倒置显微镜为日本 Olympus 产品。

1.3 培养基 放线菌固体培养基采用高氏 1 号琼脂培养基; 放线菌液体培养基由葡萄糖 2 g, 可溶性淀粉 1 g, 酵母膏 1 g, 牛肉膏 0.3 g, CaCO₃ 0.2 g, K₂HPO₄ 0.05 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g, 蒸馏水 100 ml (调 pH 值至 7.0) 组成。

真菌固体培养基采用 PDA 培养基; 真菌液体培养基由甘露醇 2 g, 甘露糖 2 g, 葡萄糖 1 g, 味精 1 g, KH₂PO₄ 0.05 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.03 g, 酵母膏 0.3 g, 蒸馏水 100 ml (调 pH 值至 6.5) 组成。

1.4 样品来源 供试土壤样品采自贵州省施秉县。采用 5 点混合采样法^[4], 选择不同海拔高度的冬凌草植株, 在植株周围多点挖取 20~40 cm 土层根系, 先抖落大块不含根系的土壤, 然后取根系表面的细粒土壤装入无菌自封袋内混匀, 作为根际土壤。

1.5 微生物菌株分离纯化 放线菌分离固体培养基采用高氏 1 号琼脂培养基(加入适量重铬酸钾, 以抑制真菌和细菌生长); 真菌分离固体培养基采用 PDA 培养基(加入适量氯霉素, 以抑制放线菌和细菌生长)。以稀释度为 10⁻¹~10⁻⁴ 的 0.2 ml 土壤稀释液涂布接种, 28℃ 培养 3~30 d, 每个稀释度设 3 个平行。待生长出菌落后, 挑选形态差异较大的菌落划线纯化, 纯化菌种于 4℃ 冰箱冷藏备用。结果分离得到冬凌草根际土壤放线菌 112 株、真菌 95 株。

1.6 微生物的发酵培养与样品制备 从原保存固体斜面培养基取放线菌和真菌适量, 分别接种于放线菌和真菌固体斜面培养基上, 于 28℃ 培养箱中静置、活化培养 5~8 d。从固体斜面培养基取活化培养的放线菌和真菌适量, 分别接种到 50 ml 三角瓶内 10 ml 放线菌和真菌相应的液体培养基中, 于 28℃ 摇床中 180 r/min 振荡培养 7 d。取全部发酵物, 超声破碎菌体细胞, 按体积比加入 2 倍量的甲醇, 静置过夜, 离心取上清液, 浓缩至干, 于 -20℃ 冰箱中冷藏备用。

1.7 丽丝胺罗丹明 B(SRB) 法筛选

1.7.1 待测样品液的配制。 称取 207 株微生物的测试样品适量, 用适量甲醇配制成一定浓度的溶液, 保存于 -20℃ 冰箱中。临用前, 用甲醇稀释成所需浓度的溶液, 供测活性。

1.7.2 细胞培养。 活性筛选采用人慢性髓性白血病 K562 细胞系。细胞用含浓度 10% FBS 的 RPM-1640 培养基, 在 37℃ 通入 5% 二氧化碳的细胞培养箱中继代培养。

1.7.3 SRB 法操作方法^[5]。取对数生长期的人慢性髓性白血病细胞 K562, 用新鲜的 RPM-1640 培养基配制成密度为 2

$\times 10^5$ 个/ml 的细胞悬液,按每孔200 μ l 接种于96 孔板中,每孔加入2 μ l 不同浓度的样品或空白溶液,37 $^{\circ}$ C 下培养24 h。取药物作用下培养后的细胞,首先在光学显微镜下观察药物处理引起的形态学变化,判断有无细胞周期抑制以及细胞凋亡或细胞坏死的形态学特征。每孔细胞中加入浓度80% 三氯醋酸50 μ l,置于4 $^{\circ}$ C 固定1 h,用水冲洗5 次,空气干燥。每孔加入浓度0.4% SRB 的醋酸溶液50 μ l,并在室温静置30 min。用浓度1% 醋酸水清洗4 次,除去未结合的游离SRB 染料。每孔加入150 μ l 10 mmol/L Tris 缓冲液(pH 值10.5) 溶解蛋白结合染料,并利用酶标仪测定每孔在波长570 nm 处的光密度值(OD)。在同一块96 孔板中,样品的每个浓度均设置3 孔,另设3 孔空白对照和无细胞调零孔(若药物有颜色,则要做相应药物浓度无细胞调零)。各孔 OD 先做相应无细胞调零,再取3 孔平均 OD。按以下公式计算每个浓度下的细胞增殖抑制率(IR)。

$$IR = (OD_{\text{空白对照}} - OD_{\text{样品}}) / OD_{\text{空白对照}} \times 100\% \quad (1)$$

2 结果与分析

以抑制 K562 细胞增殖为指标,对207 株冬凌草根际微生物发酵产物进行抗肿瘤活性筛选。由表1 可知,在100 μ g/ml 浓度下,对 K562 细胞增殖活性抑制率大于40% 的活性菌株共有27 株,阳性率为13.0%。活性菌株包括放线菌13 株(11.6%)、真菌14 株(14.7%)。由表2 可知,编号为 THSF-093、THSF-014、THSF-025、THSF-016、THSF-077 的真菌和编号为 THSA-015、THSA-006、THSA-107、THSA-081、THSA-009 的放线菌发酵样品明显抑制 K562 细胞增殖活性,在镜检下可观察到使 K562 细胞发生明显的坏死性形态变化并伴有部分细胞凋亡。

表1 冬凌草根际微生物抗肿瘤活性菌株筛选结果

Table 1 The screening results of anti-tumour active strains from the rhizosphere microorganisms of *Rabdosia rubescens*

种类 Species	分离菌株 Number of isolated strains	活性菌株 Active strains	
		数量 Number	百分比 % Percentage
放线菌 Actinomycete	112	14	12.5
真菌 Fung	95	13	13.7
总计 Total	207	27	13.0

3 小结与讨论

根际土壤通常是指去掉根部大块土壤、有机质后仍然粘附在根表面的土壤,该区域一般仅几毫米宽。在植物、土壤和微生物的相互作用下,根际区域形成了特殊的土壤生态系统,其理化、生物学特性等有别于非根际生态系统^[6]。根际土壤微生物生活在植物的根际周围,形成一个相对稳定的微生态环境。目前,人们正采取各种手段寻找新的高效药物,

其中微生物作为一类资源有其独特的优势。微生物形体极小,代谢类型多样,生长繁殖速度惊人,所以它既可以提供多样化的产品,又适于人工控制条件下的大规模生产。从分子生物学观点来看,微生物的基因组较小,调控系统相对简单,进行基因操作要比动植物容易得多。对微生物资源的开发,不存在“过度”问题,也不会因开发造成原产地微生物资源减少或绝灭的问题^[7]。根际土壤微生物作为一种新兴的微生物资源,同样具备以上优势,具有广阔的开发前景。

表2 活性菌株对 K562 细胞增殖的抑制作用

Table 2 The inhibition of active strains to the proliferation of K562 cells %

序号 No.	菌株编号 Strain code	抑制率 Inhibition rate	序号 No.	菌株编号 Strain code	抑制率 Inhibition rate
1	THSA 015	60.3	15	THSF 093	70.9
2	THSA 006	58.2	16	THSF 014	67.1
3	THSA 107	58.2	17	THSF 025	66.9
4	THSA 081	50.9	18	THSF 016	59.2
5	THSA 009	50.6	19	THSF 077	51.7
6	THSA 020	49.7	20	THSF 038	51.4
7	THSA 021	48.5	21	THSF 090	46.6
8	THSA 102	47.4	22	THSF 005	46.3
9	THSA 023	47.0	23	THSF 033	44.0
10	THSA 042	45.5	24	THSF 051	41.2
11	THSA 051	45.2	25	THSF 062	40.7
12	THSA 067	44.4	26	THSF 073	40.4
13	THSA 079	44.1	27	THSF 023	40.0
14	THSA 028	42.5			

国内外对植物根际土壤微生物进行了广泛研究,但其微生物学机理尚不清楚。从根际微生物中寻找活性代谢产物的研究鲜有报道。该文利用体外抗肿瘤筛选模式筛选出207 株冬凌草根际土壤微生物,得到活性菌株27 株。从植物根际土壤微生物中寻找抗肿瘤活性菌株的研究尚属首次。研究结果表明,药用植物根际土壤微生物可能是寻找抗肿瘤活性代谢产物的良好资源。

参考文献

- [1] 左海军,李丹,吴斌,等.冬凌草的化学成分及其抗肿瘤活性[J].沈阳药科大学学报,2005,22(4):258-262.
- [2] 薛健,宋洁,沈彩霞.冬凌草的抗肿瘤作用研究[J].时珍国医国药,2007,18(9):2277-2288.
- [3] 卢海英,梁敬钰,陈荣.冬凌草的化学成分[J].中国天然产物,2007,5(4):269-271.
- [4] 许光辉,郑洪元.土壤微生物分析方法手册[M].北京:中国农业出版社,1996.
- [5] 张均田.现代药理实验方法[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998:822-823.
- [6] 郑艳.中药材的地道性与根际土壤微生物[J].现代中药研究与实践,2007,21(6):60-63.
- [7] 姜成林,徐丽华.微生物资源开发利用[M].北京:中国轻工业出版社,2001:1-3.

[J].沙棘,2001,12(3):28-30.

- [3] 刘风云.沙棘总黄酮的药理研究概况[J].中药材,2004,27(2):145-147.
- [4] 高彦祥,崔亚娟.沙棘中黄酮类化合物的研究进展[J].饮料工业,2006,9(1):17-23.

(上接第10942页)

参考文献

- [1] 金怡,姚敏.沙棘的研究概况[J].中医药信息,2003(3):21-22.
- [2] 刘朵花,李建辉,吴伸.沙棘果肉和叶中黄酮类化合物组分的比较研究