

冬凌草内生真菌抗肿瘤活性菌株筛选

高蓬明 (贵阳学院生物与环境工程系, 贵州贵阳 550005)

摘要 [目的] 筛选冬凌草内生真菌抗肿瘤活性菌株, 为开发利用冬凌草内生真菌资源提供依据。[方法] 以药用植物冬凌草为试验材料, 分离筛选能产抗肿瘤活性物质的内生真菌。通过组织分离法, 从贵州省施秉县产冬凌草中分离到 152 株植物内生真菌, 利用抗肿瘤体外细胞增殖抑制筛选模型(SRB 法) 对其进行活性检测。[结果] 结果表明, 20 株内生真菌(占总分离菌株的 13.1%) 对人慢性髓性白血病 K562 细胞具有显著的增殖抑制活性。[结论] 冬凌草内生真菌是寻找抗肿瘤活性代谢产物的良好资源。

关键词 冬凌草; 内生真菌; 抗肿瘤; 筛选

中图分类号 S567.23⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)29-12759-02

Screening of Antitumor Strains from Endophytic Fungi in *Rabdosia rubescens*

GAO Peng-ming (Biological and Environment Engineering Department, Guiyang University, Guiyang, Guizhou 550005)

Abstract [Objective] The research aimed to screen the antitumor strains from endophytic fungi in *Rabdosia rubescens* and provide the basis for exploring and utilizing endophytic fungi resources. [Method] 152 strains of endophytic fungi were isolated from *Rabdosia rubescens* in Shibing County of Guizhou Province. And their fermented products were screened with K562 cells by SRB method. [Result] The results showed that 20 strains had cell proliferation inhibitory activity on K562 cells, which possessed 13.1% of total 152 strains tested. [Conclusion] Endophytic fungi from *Rabdosia rubescens* are well resources for researching antitumor metabolites.

Key words *Rabdosia rubescens*; Endophytic fungi; Antitumor; Screening

内生真菌的资源极其丰富, 据估计自然界中内生真菌总数可能超过 100 万种^[1]。植物内生真菌几乎存在于所有植物体内, 能产生各种生物活性的次级代谢产物, 既能产生和宿主植物活性成分相同或相似的活性成分, 也能产生和宿主植物活性成分完全不同的活性成分, 因此内生真菌是天然活性物质的重要来源^[1-3]。而且内生真菌也易于发酵培养, 便于组织工业化生产, 因此进行植物内生真菌的研究, 提取其具有生理活性的次生代谢物, 直接开发利用或用于新药的研究开发, 前景都十分广阔。近年来, 国内已陆续报道了从多种药用植物中分离获得了产生多种药理活性物质的内生真菌^[4-6]。自从 1993 年 Stierle 报道, 从短叶红豆杉中分离到能产生紫杉醇的内生真菌以来^[7], 人们从多种药用植物的内生真菌中陆续分离到抗肿瘤活性物质^[8-9], 药用植物内生真菌成为人们寻找新型抗肿瘤药物的重要来源。

冬凌草在民间用于治疗食管癌, 其主要抗癌活性成分为冬凌草甲素和冬凌草乙素。国内外学者对冬凌草及同属植物的化学成分、药理作用、构效关系、临床应用、开发应用等进行了大量研究^[10]。然而迄今为止, 未见有关冬凌草包括内生真菌在内的相关微生物资源研究的报道。特别是近年来, 随着冬凌草含片、冬凌草片等中成药及冬凌草茶等保健品的生产量扩大, 对冬凌草野生资源的破坏越来越严重^[11]。因此, 对冬凌草内生真菌进行研究, 分离得到生理活性成分, 提供开发利用新途径就显得尤为重要。为此, 笔者对贵州省施秉县冬凌草的内生真菌进行了初步研究, 分离得到内生真菌并对其抗肿瘤活性筛选, 旨在为冬凌草相关微生物资源的综合开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基。PDA 液体和固体培养基^[9]。

1.1.2 材料与试剂。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 RPMI-1640 细胞培养基分别为 Hyclone 公司和 GIBCOBRL 公司产品; 其他试剂均为市售分析纯试剂。

1.1.3 仪器。酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司 Versa max 型; 电动吸引机, 上海医疗器械工业集团公司 YB-DX23B 型; 生化培养箱, 上海跃进集团 SPX-250B 型; 摇床, 上海福玛试验设备有限公司 QYC-211 型; 超净工作台, 苏净集团 SW-CJ-ZFD 型; CO₂ 细胞培养箱, 日本三洋公司产品; 普通及倒置显微镜, 日本 Olympus 产品。

1.2 方法

1.2.1 冬凌草内生真菌分离纯化。冬凌草植株采自贵州省施秉县。按常规无菌操作, 取冬凌草的根、茎、叶、皮, 按下列程序表面消毒: 自来水冲洗→75% 酒精漂洗(3~5 min)→无菌水冲洗 5 次→0.1% 升汞漂洗(10~30 s)→无菌水冲洗 5 次。将经过处理的样品在无菌条件下切割成小片, 贴放于含终浓度 50 mg/L 庆大霉素的 PDA 固体平板培养基上, 置 28℃ 温箱培养 3~7 d 后, 即可见样品切割过的边缘有菌丝长出, 经纯化后转接到 PDA 斜面上备用^[9]。菌种于 4℃ 冰箱保存。

1.2.2 微生物的发酵培养与样品制备。从原保存固体斜面取真菌适量, 分别接种于 PDA 固体斜面培养基上, 于 28℃ 培养箱中静置、活化培养 5~8 d。

从斜面取活化培养的真菌适量, 分别接种到 50 ml 三角瓶内 10 ml 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, 所得固形物为供筛活性的测试样品, 共得到供测试样品 152 个, 于 -20℃ 冰箱中冷藏备用。

1.2.3 丽丝胺罗丹明 B(SRB)法筛选。

1.2.3.1 待测样品液的配制。称取 152 株内生真菌的测试样品适量, 用适量甲醇配制成一定浓度的溶液, 于 -20℃ 冰箱中保存, 临用前用甲醇稀释成所需浓度的溶液, 供测活性。

1.2.3.2 细胞培养。活性筛选采用人慢性髓性白血病 K562

作者简介 高蓬明(1964-), 女, 云南昆明人, 副教授, 从事微生物学及资源开发利用的教学与研究工作。

收稿日期 2008-07-09

细胞系。细胞用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基,在 37 ℃、通入 5% 二氧化碳的细胞培养箱中継代培养。

1.2.3.3 SRB 法操作方法^[12]。取对数生长期的人慢性髓性白血病细胞 K562,用新鲜的 RPMI-1640 培养基配制成密度为 2×10^5 个细胞/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 ℃ 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、细胞凋亡或细胞坏死的形态学特征。每孔细胞中加入 80% 三氯醋酸 50 μ l,于 4 ℃ 固定 1 h,用水冲洗 5 次并空气干燥。每孔加入 0.4% SRB 的醋酸溶液 50 μ l,并在室温静置 30 min。用 1% 醋酸溶液清洗 4 次,除去未结合的游离 SRB 染料。每孔加入 150 μ l Tris 缓冲液(10 mmol/L, pH 值 10.5)溶解蛋白结合染料,并利用酶标仪测定每孔在 570 nm 处的光密度(OD)值。在同一块 96 孔板中样品的每个浓度均设置 3 个孔,另设 3 个空白对照孔和无细胞调零孔(如果药物有颜色要作相应药物浓度无细胞调零)。各孔 OD 值先作相应无细胞调零,再取 3 个孔的平均 OD 值,按下式计算每个浓度下的细胞增殖抑制率(IR)。

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

2 结果与分析

对 152 株冬凌草内生真菌发酵产物进行以抑制 K562 细胞增殖为指标的抗肿瘤活性筛选,在 100 μ g/ml 浓度下,对 K562 细胞增殖活性抑制率大于 25% 的活性菌株共有 20 株,阳性率为 13.1%。活性菌株对 K562 细胞增殖抑制作用如表 1 所示。其中菌株编号为 DLCEF 106、DLCEF 103、DLCEF 017、DLCEF 110、DLCEF 026 的真菌发酵样品具有十分显著的抑制 K562 细胞增殖的作用,在镜检下即可观察到使 K562 细胞发生显著的坏死性形态变化,并伴有部分凋亡细胞的形态。

表 1 活性菌株对 K562 细胞增殖抑制作用

Table 1 Effects of active strains on proliferation inhibition of K562 cells

序号 No.	菌株编号 Strain No.	抑制率/% Inhibition rate	序号 No.	菌株编号 Strain No.	抑制率/% Inhibition rate
1	DLCEF 106	94.3	11	DLCEF 046	43.1
2	DLCEF 103	67.3	12	DLCEF 014	42.6
3	DLCEF 017	66.4	13	DLCEF 088	36.0
4	DLCEF 110	53.8	14	DLCEF 031	35.5
5	DLCEF 026	53.6	15	DLCEF 062	35.3
6	DLCEF 149	48.1	16	DLCEF 011	33.3
7	DLCEF 012	46.6	17	DLCEF 032	30.4
8	DLCEF 002	46.3	18	DLCEF 115	30.2
9	DLCEF 029	46.2	19	DLCEF 023	28.9
10	DLCEF 055	43.2	20	DLCEF 072	27.9

3 结论与讨论

内生真菌由于其所处的特殊环境,会产生一些独特的成分,是寻找生物活性物质的重要来源。由于植物是真核生物,也是一个选择对高等生物具有较少毒性的天然微生物活性成分的选择系统,内生真菌所产生的抗生素具有较少的细胞毒性。这就使内生真菌在医药开发方面具有特别重要的意义^[2,11]。“内共生理论”认为,在共生体内,一旦次生代谢

中有用生化途径的表现,它就能被其他生物所利用,表现出相互作用和“协同进化”(Co-evolution)^[13-14]。由此产生的假设是:具有相同次生代谢产物生物合成的途径是获得了相关基因的直接传递。这种传递可以发生在“共生生物—寄主”或“寄主生物—寄主”间的相互作用过程中,或者更直接地在共同生活的环境中,经长期相处直接接触而传递遗传物质^[15-16]。因此,宿主可能将其遗传物质或信息传递给其内生真菌,使之在一定程度上具有和宿主相同或类似的代谢途径,并导致其产生某些特定物质^[15,17]。人们已经从药用植物中分离到能够产生具有宿主植物活性的次生代谢产物的内生真菌^[18-20],某些内生真菌还能产生新的活性成分^[21-22]。药用植物内生真菌能产生与宿主次生代谢产物相同或类似活性成分的原因尚需深入研究。

目前对其中的一些活性菌株的次级代谢产物正在进行分离纯化,并对其生物活性进行跟踪鉴定,期望能够从中发现有应用价值的化合物。选择药用植物作为内生真菌的分离材料,是因为药用植物本身就能产生多种活性成分,有的内生真菌能产生与宿主相同或相似的活性物质,因此从药用植物中分离到产生活性物质的内生真菌的机率可能就更大。况且内生真菌与宿主植物关系多种多样,其自身生长因受微环境的影响,次生代谢产物非常丰富,也可能有一些内生真菌可产生与宿主植物不同的活性成分。植物内生真菌的生境特殊性决定了其既有理论研究的广度和深度,又有多方面的应用潜力,是个潜力巨大、尚待开发的微生物新资源。

植物本身主要的生物活性成分所在部位与具有生物活性的内生菌所在部位有一定的相关性。该研究发现,具有抗肿瘤活性的冬凌草内生真菌主要分离自冬凌草的根,其次是枝条,叶中最少。这可能是叶片中的内生真菌的种类易受环境的影响^[23],不是与宿主长期共生的菌群所致。分离的样品常受空气和植物体表上杂菌的污染。为了去除污染的细菌,需要向培养基内加入抗菌剂,并尽可能从消毒的分离物内部取样分离,以保证宿主内生真菌的分离纯度。内生真菌菌种随人工培养基上传代次数的增多易发生变异。因此,掌握好菌种培养时间、减少传代次数、做好菌种的分离、复壮与保藏工作,可以防止菌种发生老化和退化。

从目前的研究状况看,关于植物内生真菌的研究还不够深入,还有许多问题尚待解决。首先,在内生真菌分离筛选过程中,在同一种植物中可以分离到数株相同的内生真菌,这造成内生真菌代谢产物生物活性测定工作的很多重复。为了避免重复研究,可以根据实验室条件和研究侧重点不同进行菌种鉴定或者通过化学手段进行排查。其次,由于内生真菌长期生活在寄主植物内部,其菌株的生理活动和代谢息息相关,一旦从寄主植物中分离出来后,自身的一些特性也会随之消失,菌种容易出现退化现象。这就加大了内生真菌中次生代谢产物研究的难度。因此,在内生真菌的分离过程中,优化和改良培养条件或者在体外模拟宿主体内的生存环境可能有助于分离得到更多的内生真菌,这是值得深入研究的课题。

参考文献

[1] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152.

(下转第 12866 页)

平上提示逆环境因子对生物带来的伤害,是有用的生物监测指标,但最好是几种酶共同运用以提高监测的准确性。

(2)SOD 是生物细胞中最重要的清除自由基的酶之一,能清除超氧阴离子基,以保护细胞免受损伤。Livingstone 等在用贻贝类生物 *Mytilus galloprovincialis* 评价有机污染物的影响时,曾指出 SOD 指标并不是监测危险区域的适当指标^[6]。该试验结果表明,SOD 酶活性在第一个暴露阶段(10 d)出现诱导现象,且诱导的强度与底泥污染的程度一致,这种一致性表明 SOD 能够反映不同程度的污染状况。但其诱导作用并未随时间延长而持续,最终活性逐渐与对照接近,表现出适应趋势。因此,认为 SOD 酶活性基本上能反映出污染浓度及暴污时间的差异,可以较好地指示污染的程度,但建议应用该生物指标时,暴污时间不宜过长。

(3)POD 和 CAT 是生物体内的重要功能酶之一,是清除过氧化物。室内模拟组和笼内放养组各时间段 POD 酶的活性与对照组的测定值相比皆有提高,但室内模拟组各时间段的变化却并不一致。不同污染程度的底泥 10 d 对 POD 酶的诱导幅度,在蔺家坝、洞山西和红旗新村各样点均与污染的轻重相一致,随污染加重,诱导作用加强,但位于下游的解台闸污染程度明显比上游的蔺家坝重,其 POD 酶的诱导作用反而比蔺家坝弱,原因有待进一步研究。基于以上原因认为 POD 酶活性基本上能反映出污染浓度及暴污时间的差异,但建议应用时与其他生物指标共同使用。

(4)试验结果显示,CAT 酶活性受到抑制,并且随着时间的延长,抑制作用加强,这与熊尚青等^[3]、余群等^[1]、戴家银等^[7]的试验结果相符,但与 Dimitrova 等^[8]及 Livingstone 等^[9]观察到 CAT 的诱导现象相反。推测污染物对水生生物

的亚致死伤害很可能是通过激发活性氧的产生。这种氧化胁迫应该有一个阈值,当胁迫严重,超过该阈值时,CAT 酶活性就可能因为中毒而受到抑制。

(5)室内模拟法、笼内放养法与直接采样法测定 SOD、POD 和 CAT 3 种保护酶的试验方法比较,笼内放养方法最好,其次为室内模拟法,而直接采样不宜采用,这是因为螺长期在污染环境生活,其体内的酶也表现出一定的适应,难以反映污染状况。

参考文献

- [1] FRIDOVICH I. Oxygen is toxic [J]. *Bioscience*, 1977, 27(7): 462-465.
- [2] 余群,郑微云,翁研. 石油污染对真鲷幼体中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的毒理效应[J]. *厦门大学学报:自然科学版*, 1999, 38(3): 429-434.
- [3] 熊尚青,由文辉. 苏州河底泥对铜锈环棱螺 (*Bellamyia aeruginosa*) SOD 和 CAT 的影响[J]. *华东师范大学学报:自然科学版*, 2002, 4(12): 96-101.
- [4] 李周直,沈惠娟,蒋巧根,等. 几种昆虫体内保护酶活性的研究[J]. *昆虫学报*, 1994, 37(4): 399-403.
- [5] 王晓,韩宝平,丁毅,等. 京杭大运河徐州段底泥重金属污染评价[J]. *能源环境保护*, 2004, 18(3): 47-49.
- [6] LIVINGSTONE D R, LEMAIRE P, MATTHEWS A, et al. Assessment of the impact of organic pollutants on goby *Zostericessor ophiocephalus* and mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon [J]. *Mar Environ Res*, 1995, 39(2): 235-240.
- [7] 戴家银,郑微云,王淑红. 铜和锌离子对真鲷幼鱼组织酶活性的影响[J]. *环境科学*, 1998, 19(5): 60-62.
- [8] DIMITROVA M S, TISHINOVA V, VELCHEVA V. Combined effects of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp *Cyprinus carpio* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1994, 103(3): 43-46.
- [9] LIVINGSTONE D R, LEMAIRE P, MATTHEWS A A, et al. Prooxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin o-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals [J]. *Mar Pollut Bull*, 1993, 26(2): 602-606.
- [10] 卢海英,梁敬钰,陈荣. 冬凌草的化学成分[J]. *中国天然产物*, 2007(4): 269-271.
- [11] 陈随清,董诚明,冯卫生. 太行山区冬凌草生态环境及生物学特性研究[J]. *中国野生植物资源*, 2005(24): 33-35.
- [12] 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.
- [13] 苏印泉,朱红薇,马希汉,等. 杜仲内生真菌的抑菌活性筛选[J]. *西北植物学报*, 2005(6): 1153-1157.
- [14] ROTH J, LEROITH D. The evolutionary origins of intercellular communication and the maginot lines of the minds [J]. *Ann New York Academ Sci*, 1986, 436: 1-11.
- [15] 何颖,谈锋,谢建平. 红豆杉内生真菌产紫杉醇研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2006(3): 519-523.
- [16] 梁宗琦. 真菌次生代谢产物多样性及其潜在应用价值[J]. *生物多样性*, 1999, 7(2): 145-150.
- [17] 曾松荣,徐成东,王海坤,等. 药用植物内生真菌及其具宿主相同活性成分的机制初探[J]. *中草药*, 2000(31): 306-308.
- [18] 杨显志,郭仕平,张玲琪,等. 鬼臼类植物产鬼臼毒素内生真菌的筛选[J]. *天然产物研究与开发*, 2003, 15(5): 419-422.
- [19] 杨显志,张玲琪,郭波,等. 一株产长春新碱内生真菌的初步研究[J]. *中草药*, 2004, 35(1): 79-81.
- [20] 刘吉华,余伯阳. 喜树内生真菌的分离及其抗肿瘤活性代谢产物的筛选方法[J]. *植物资源与环境学报*, 2004, 13(4): 6-10.
- [21] WAGENAAR M M, CORWIN J, STROHEL G, et al. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinochladia* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63: 1692-1695.
- [22] LU H, ZOU W X, MENG J C, et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua* [J]. *Plant Science*, 2000, 151: 67-73.
- [23] FAETH S H, HAMMON K E. Fungal endophytes in oak trees: Long-term patterns of abundance and associations with leaf-miners [J]. *Ecology*, 1997, 78: 810-819.

(上接第 12760 页)