

海南文昌清澜港红树林真菌抗 B16 肿瘤细胞活性菌株的筛选

缪承杜^{1,2}, 庄令¹, 林海鹏¹, 洪葵¹

1 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101

2 海南大学农学院, 儋州 571737

摘要: 从海南文昌清澜港红树林采集 78 份植物组织和土壤样品。对样品进行真菌分离, 共分离得到真菌 608 株, 采用目测法对其体外抗肿瘤细胞活性进行检测, 发现 81 株红树林真菌对小鼠黑色素瘤 B16 细胞有不同程度的抑制作用, 占总分离菌株的 13.32%。结果表明, 从红树植物杯萼海桑中分离得到真菌菌株的数量最多, 而从红树植物银叶树分离得到的抗肿瘤细胞活性菌株数量最多。

关键词: 红树林, 真菌, 分离, 抗 B16 肿瘤细胞活性

Screening of Cytotoxic Activity Against B16 Tumor Cell of Mangrove Fungi Isolate from Qinglan Harbor in Hainan

Chengdu Miao^{1,2}, Ling Zhuang¹, Haipeng Lin¹, and Kui Hong¹

1 The Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Haikou 571101, China

2 Agricultural College, Hainan University, Danzhou 571737, China

Abstract: Six hundred and eight fungi strains were isolated from seventy-eight samples of mangrove plants and soil that collected from Qinglan harbor. Cytotoxic activity was detected by observing the growth inhibition or killing of the tumor cells under microscope. The result showed that 81 strains (about 13.32% of the total strains isolated) displayed cytotoxic activity against B16 tumor cell. The most fungi strains were isolated from mangrove plant *Sonneratia alba*, and most of cytotoxic active fungi strains were isolated from mangrove plant *Heritiera littoralis*.

Keywords: mangrove, fungi, isolate, cytotoxicity against B16 tumor cell

自从青霉素引入了医学界, 就标志着真菌抗生素的时代已经开始。由于各种原因和条件限制, 海洋真菌的代谢研究起步比较晚, 直到 1986 年才由 Schiehsler GA 发表了第一个从海洋真菌中分离的有抗菌活性的天然产物 Leptosphaerin^[1]。到 1992 年, 从

海洋真菌中发现的活性产物只有十几个, 到 2002 年为止, 共发现新天然产物 272 种^[2], 粗略地统计表明, 从海洋真菌中分离的代谢产物 80% 具有各种各样的生理活性^[3]。从印度西海岸地区几种红树林根部分离出的真菌的研究结果表明, 红树根部的真菌群落

Received: January 15, 2008; **Accepted:** March 12, 2008

Supported by: the Social Public Welfare Project of the Ministry of Science and Technology (No. 2004DIB3J072).

Corresponding author: Kui Hong. Tel: +86-898-66984969; E-mail: k1022@163.net

科技部社会公益项目(No. 2004DIB3J072)资助。

包括了陆地、海洋和淡水的真菌^[4],证明红树林这种介于陆地和海洋之间特殊的生态系统中丰富的真菌多样性。目前已分离鉴定的红树林真菌超过 200 种,成为海洋真菌的第二大类群。

红树林真菌的多样性和特殊性为人类提供了许多结构新颖、具有抗肿瘤活性的先导化合物,是极好的新型抗肿瘤药物潜在资源。本研究正是以拥有我国 90%^[5]红树品种的海南文昌清澜港红树林作为采样地点,进行真菌的分离培养、发酵,并进行细胞毒活性检测,为获得新抗肿瘤药物提供良好的材料。

1 材料与amp;方法

1.1 样品来源

从 2004 年至 2005 年期间,在海南省文昌清澜港红树林保护区采集 78 份样品,样品类型包括红树植物、半红树植物的不同组织及其土壤。土壤样品是在离目的树种 1~2 m 的范围内,取离地 5~20 cm 的土壤;根、叶片、果实和花均采自树上,采后主要是分离其内生和附生真菌。样品采集后放入无菌塑料封口袋内,冷藏,迅速运回实验室并立即进行样品处理。

1.2 样品处理

1.2.1 土壤

称取 5 g 样品,在无菌操作下加入盛有 50 mL 无菌 50%陈海水(蒸馏水与海水各半)的三角瓶中,用涡漩振荡器充分振荡均匀后,于 28℃,200 r/min 摇床振荡 0.5 h,后放置澄清,取上清备用。

1.2.2 植物组织

分别称取 5 g 根、果、树叶和花,无菌水冲洗后,在无菌操作下剪碎,研磨,然后分别加入到盛有 50 mL 无菌 50%陈海水(蒸馏水与海水各半)的三角瓶中,用涡漩振荡器充分振荡均匀后,于 28℃,200 r/min 摇床振荡 0.5 h,后放置澄清,取上清备用。

1.3 菌株分离培养

采用稀释涂布法对 78 份样品的真菌进行分离纯化,将样品上清液制备成 10^{-1} 至 10^{-3} 不同稀释度的菌悬液,各取 100 μ L 菌悬液涂布在马丁培养基(50%陈海水配置、1%氯霉素)上,置于 28℃ 培养,对平板上生长的不同形态的菌落进行编号并观

察记录。

1.4 接种发酵

根据菌落形态特征,挑取单菌落接种于黄豆粉培养基^[6]中,发酵 5 d (200 r/min, 28℃)。发酵液离心(10 000 r/min, 4℃, 10 min) 取上清,上清用 0.22 μ m 孔径的微孔滤膜过滤备用。

1.5 活性测定^[6]

1.5.1 测活细胞及其培养基

测活细胞:小鼠黑色素瘤 B16 细胞,购于武汉大学中国典型培养物保藏中心。细胞培养基: MEM 培养基,临用前加 10%的胎牛血清。消化液配制:分别配制胰蛋白酶消化液和 Versene 消化液,用时二者按 1:3(V/V)混合。阳性药物:400 ppm 的丝裂霉素。

1.5.2 目测法活性测定

取对数生长期的 B16 细胞用胰酶-Versene 消化液消化,调整细胞浓度约为 4000 个/100 μ L,以 98 μ L/孔加至 96 孔平底培养板培养 24 h。加入待测样液 2 μ L/孔,继续培养 72 h,然后取出 96 孔板置于倒置显微镜 10 \times 10 倍的低倍镜观察细胞形态。

根据细胞形态变化程度,将样品的活性分为 4 级:“+++”表示细胞全部死亡,强活性;“++”表示细胞形态严重变形,中等活性;“+”表示细胞形态轻度变形,弱活性;“-”表示细胞形态正常,无活性。

2 结果与分析

2.1 红树林真菌的分离及活性测定

共分离获得 608 株红树林真菌菌株,经筛选得到具有细胞毒活性菌的菌株共 81 株,活性菌株比率为 13.32%。

2.2 不同树种的细胞毒活性真菌菌株数量和活性比率

在海南清澜港采样地点,从不同树种中分离筛选得到的真菌菌株数量及活性菌株比率都有较大的差异(表 1)。

从红树植物杯萼海桑分离得到了真菌菌株最多,为 59 株,活性菌株有 6 株,活性比率为 10.16%;从红树植物银叶树分离得到的真菌菌株活性比率最高,23.21%。从海南海桑、卵叶海桑、玉蕊中分离得到的真菌菌株非常少,而且活性比率也最低。

2.3 不同采样部位的细胞毒活性真菌菌株数量和活性比率

本研究采集了 18 种红树植物、4 种半红树植物的叶以及土壤样品。由于红树林植物花期、果期的时间和其他客观因素的影响, 本研究采集了部分红树林树种的果实、花、树皮和根等植物组织。从各

植物组织以及土壤样品分离得到的真菌菌株数量和活性菌株比率情况如下表 2。从红树林植物土壤中分离得到最多的真菌菌株, 占总分离真菌菌株的 37.01%, 而从红树林植物树皮中分离得到活性真菌菌株的比率最高。

表 1 红树林不同树种分离的真菌菌株数及活性比率
Table 1 The activity ratio and quantity of fungi strains isolated from distinct mangrove trees

Classification	Tree species	Number of fungi isolates	Active strains	Activity ratio/%
Mangrove plant	<i>Avicennia marina</i>	46	4	8.51
	<i>Sonneratia alba</i>	59	6	10.16
	<i>Bruguiera sexangula</i>	13	1	7.69
	<i>Sonneratia hainanensis</i>	4	0	0.00
	<i>Excoecaria agallocha</i>	27	2	7.40
	<i>Sonneratia caseolaris</i>	27	5	18.51
	<i>Acrostichum speciosum</i>	22	2	9.09
	<i>Ceriops tagal</i>	38	7	18.42
	<i>Lumnitzera racemosa</i>	13	1	7.69
	<i>Acanthus ilicifolius</i>	22	3	13.63
	<i>Acrostichum aureum</i>	36	3	8.33
	<i>Sonneratia ovata</i>	3	0	0.00
	<i>Aegiceras corniculatum</i>	28	5	17.86
	<i>Heritiera littoralis</i>	56	13	23.21
	<i>Xylocarpus granatum</i>	39	5	12.82
	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	34	6	17.64
	<i>Sonneratia paracaseolaris</i>	18	2	11.11
	Semi-mangrove plant	<i>Kandelia candel</i>	36	4
<i>Barringtonia pendula</i>		4	0	0.00
<i>Cerbera odollam</i>		38	8	21.05
<i>Hibiscus tiliaceus</i>		32	4	12.50
Total	<i>Pongamia pinnata</i>	13	0	0.00
Total		608	81	13.32

表 2 各植物组织以及土壤样品分离得到的真菌数量和活性菌株比率
Table 2 The activity ratio and quantity of fungi strains isolated from respective plant tissues and soil samples

Isolated parts	Number of samples	Number of fungi isolates	Account for the total amount of fungi isolates/%	Active strains	Activity ratio/%
root	12	120	19.73	16	13.33
fruit	6	65	10.69	5	7.68
flower	4	11	1.81	1	9.09
cortex	12	40	6.58	8	20.00
leaf	22	147	24.18	16	10.88
soil	22	225	37.01	35	15.56
Total	78	608		81	13.32

2.4 具有强活性的真菌菌株来源树种和部位的分析

从 608 株真菌细胞毒活性检测结果上看, 有 23 株真菌具有强活性, 占总分离真菌菌株的 3.78%, 占活性菌株数的 28.31%。这 23 株真菌分布在 11

种红树林树种、15 个样品(表 3)中, 主要集中在根际土壤中。有研究表明, 自海水中活性菌株筛选得率为 10%, 海洋底泥为 27%, 共附生微生物为 48%^[7], 可见土壤中的微生物, 依然是当前研究的重点。

表 3 强活性的真菌菌株来源树种和部位

Table 3 Fungi trains with high cytotoxic activity from different trees and plant tissues

Tree species	Samples	Number of fungi isolates from that sample	High active strains
<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	Root	13	1
	Fruit	22	2
<i>Ceriops tagal</i>	Root	5	1
	Root	17	1
<i>Hibicusti lisaceus</i>	Soil	14	1
	Cortex	8	1
<i>Aegiceras corniculatum</i>	Soil	9	2
	Root	4	1
<i>Acanthus ilicifolius</i>	Soil	9	2
	Soil	31	1
<i>Sonneratia alba</i>	Soil	6	1
<i>Sonneratia paracaseolaris</i>	Soil	34	3
<i>Heritiera littoralis</i>	Soil	26	1
<i>Acrostichum aureum</i>	Soil	22	3
<i>Cerbera odollam</i>	Soil	11	2

3 讨论

在本次研究中, 从红树植物银叶树分离得到了最多抗肿瘤细胞的真菌菌株, 而且其中有 3 株具有强活性。沈振国等^[8] (2005)曾在研究红树林放线菌时, 发现在红树植物银叶树里面可以分离到比较多的放线菌菌株, 而且有 35.7%的菌株具有细胞毒性活性。结合本研究的结果, 说明在银叶树体表或体内存在着丰富的微生物群落, 并且这些微生物的代谢产物很可能具有一定的细胞毒活。

老鼠簕在我国及亚太地区其它国家的红树林海岸居民中都有传统的药物利用经验。在鼠类试验中已证明老鼠簕的根具有抗白血病的活性, 据泰国学者 Udom Kokpol 报道^[9], 在老鼠簕根中提取液中已经发现的多种成分, 其中苯并口恶唑啉能抗真菌病害, 这种化合物的核糖衍生物具有抗癌和抗病毒的活性。本研究中从红树植物老鼠簕中共分离得到 22 株真菌菌株, 有 3 株真菌有较强的细胞毒活性, 其中一株自老鼠簕的根部。可见, 红树植物老鼠簕很可能作为抗肿瘤物质的重要来源。

高昊等^[10]从本研究分离得到的一株泡盛曲霉^[11]中共分离和鉴定出 27 个化合物, 其中甾类成分 15 个, 属多羟基甾醇及其脂肪酸酯, 6 个新化合物为多羟基甾醇脂肪酸酯, 此外也得到了相关脂肪酸及其甘油单酯, 还鉴定了一系列环二肽和核苷类成分。其中结构已知的多羟基取代甾类化合物, 均有不同程度的抑制肿瘤核苷类成分。其中结构已知的多羟基取代甾类化合物, 均有不同程度的抑制肿瘤细胞的活性报道^[12,13], 如 22E-5 α , 8 α -桥二氧麦角甾-6, 22-二烯-3 β -醇, 在体外能抑制多种癌细胞株的生长: L-1210 细胞株、人乳腺癌 MCF-7 细胞、Walker 256 肉瘤细胞株、人肝癌 PLC/PRF/5 细胞、KB 细胞和小鼠黑色素瘤 B16 细胞。新甾体的肿瘤细胞毒活性正在评价中。另外, 崔海滨、韩壮等从本次研究中的其它红树林真菌菌株中, 发现多个新化合物, 部分化合物具有抗菌活性。可见, 红树林真菌确实具有能产生一些特殊的次生代谢物, 并具有各种各样的生理活性, 非常值得广泛深入地研究。

在红树林真菌抗肿瘤的研究中, 郑忠辉等^[14]从红树林植物树皮中分离出 125 株内生真菌的活性, 其

中 11 株对 KB 细胞或 HL-60 人白血病细胞具有显著的抑制活性。王若宇等^[15]从福建省红树林天然保护区中分离到的一株真菌(*Diaporthe* sp.)中分离到具有细胞毒活性一个新化合物和两个已知化合物。朱峰等^[16]从中国香港红树林种子内生真菌 2526 号中分离得到化合物柄曲霉素, 对肿瘤细胞 Bel-7402 和 NCIH-460 有弱的抑制作用。这些研究表明了, 海洋红树林真菌是一块还没有充分发掘而又有极大潜力的新领域。

闫莉萍等^[17]、郭刚等^[18]、王岳坤等^[19]对红树林土壤及植物部分微生物的资源调查和生物活性评价研究表明: 红树林土壤中大部分微生物是未被培养的。本次研究虽然得到一部分的红树林菌株, 但绝大部分的红树林真菌尚未被发现和研究, 因此, 还需红树林地区真菌资源进行更详尽的调查和生物活性评价。

致 谢: 本研究结果是在对大量样品处理的结果上得出的, 在采样、发酵、可培养微生物的分离与活性检测中, 陈华、李健娜、朱九滨、王岳坤和许云等同学参与了不同阶段的工作, 在此表示感谢!

REFERENCES

- [1] Schiehser GA, White JD. The structure of leptosphaerin. *Tetrahedron Lett*, 1986, **29**: 5591.
- [2] Tim S. Bugni, Chris MI. Marine-derived fungi: achemically and biologically diverse group of microorganisms. *J N at Prod Rep*, 2004, **21**: 143-148.
- [3] Hollor U, Kong GM, Wright AD. Three new metabolites from marine-derived fungi of the genera coniothyrium and microsphaeropsis. *J Nat prod*, 1999, **62**: 114-115.
- [4] Ananda K, Sridhar KR. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India. *Can J Microbiol*, 2002, **48** (10): 871-878.
- [5] Shan JG, Zheng XQ. Floristic Composition and Characteristics of Mangrove in Hainan Island. *Guangdong Forestry Science and Technology*, 2005, **25**(2): 41-45.
- [6] Chen H, Hong K, Zhuang L, Zhong QP. Isolation and cytotoxic activity evaluation of microorganisms from mangrove in Hainan. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2006, **27**(3): 61-63.
- [7] Fenical WL. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chem Rev*, 1993, **93**: 673-683.
- [8] Shen ZG, Hong K, Zhuang L. Ecological distribution and active evaluation on actinomycetes of mangrove. *The collection of papers for The Academic Conferences for marine Biotechnology and Drug*, 2005: 491-493.
沈振国, 洪葵, 庄令, 等. 红树林地区的放线菌生态分布及活性评价. 全国海洋生物技术与海洋药物学术会议论文集, 2005: 491-493.
- [9] Lin P. A review on the mangrove research in China. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2001, **40**(2): 592-603.
- [10] Gao H, Zhang X, Wang NL, Hong K, Yao XS. Studies on the cytotoxic steroids from mangrove fungus *Aspergillus awamori*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2006, **37** (supplement): 193-196.
- [11] Zhang ZH, Hong K, Gao H. Identification of *Mangrove (Rhizophora)* fungi strain 094811 possessing cytotoxic activities. *Journal of microbiology*, 2006, **26**(4): 6-11.
- [12] Matsueda S, Katsukura Y. Antitumor active photochemicaloxidation products of provitamin D. *Chemistry & industry*, 1985, **1**: 411-417.
- [13] Kahlos K, Kangas L, Hiltunen R. Ergosterol peroxide, an active compound from *Inonotus radiatus*. *Planta Medica*, 1989, **55**(4): 389-390.
- [14] Zheng ZH, Miao L, Huang RJ, Xu QY, Su WJ. Antitumor activity of *Mangrove* endophytic fungi. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2002, **42** (4): 513-516.
- [15] Wang RY, Huang YJ, Zheng ZH, Su WJ, Shen YM. Medium optimization for antitumor agent mycoepoxydiene by marine lignicolous fungi *Diaporthe* sp. *Microbiology*, 2006, **33**(5): 6-11.
- [16] Zhu F, Lin YC, Zhou SN, Vrijmoed LLP. Sphingosine derivatives isolated from mangrove fungi 2526# and 1850# from the south sea in china. *Chemistry and Industry of Forest Produc*, 2004, **24**(4): 10-14.
- [17] Yan LP, Hong K, Hu SC, Lin LH. 16S rDNA diversity analysis of 30 streptomycetes isolates displaying significant cytotoxic activity against B16 cell from near-shore sediments of Hainan Island. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, **45**(2): 185-190.
- [18] Guo G, Hong K, Hu SC. Screening of anti-*Magnaporthe grisea* of marine microorganism. *Mycosystema*, 2003, **22**: 432-437.
- [19] Wang YK, Hong K. Mangrove soil community analysis using DGGE of 16S rDNA V3 Fragment polymerase chain reaction products. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, **45**: 201-204.