

放线菌——微生物药物的重要资源

刘志恒

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

微生物早在 38 亿前已经在地球上发生,但人们真正认识它们的存在也只有 300 年。迄今,事实尽管说明微生物是地球生命体的主要组成者,维持着地球的生态平衡,并起着了解地球历史和地球生命健康以及开发所有应用生物技术潜能的关键作用;然而,我们对它们中的大多数仍然了解甚微。因此,微生物仍然是我们人类不断获得知识和发展生物技术的重要载体。

医药工业的发展使人们认识到微生物多样性是发展健康保护和疾病控制新药的必需和潜在的重要因素。其理由是:50% 以上的先导化合物均源于微生物;市场最低估计微生物药物大约为 500 亿美元,占居整个药物市场值的一半。

放线菌是一类比其他微生物更为丰富的生物活性物质的生物资源。历史上为抗生素工业的建立和发展发挥过巨大作用。今天随着放线菌生物多样性研究的进展,放线菌仍然具有产生新的生物活性物质的极大潜力。

1 放线菌生物多样性

1.1 生态多样性 陆生:放线菌(Actinomycetes)属于原核生物系统进化树上的高 CG %、革兰氏阳性的细菌(Eubacteria)分枝类群。分类学上定义为放线杆菌纲(Actinobacteria)中的一个目——放线菌目(order Actinomycetales)。它们是广泛地分布于土壤中的优势微生物类群。它们能降解大量和不同种类的有机化合物,对有机物的矿化有着重要功能。虽然大多数放线菌为离体腐生型微生物,但极少数也是人和动植物的致病菌。另一方面,当它们降解橡胶制品,利用燃料生长而产生污染水体的异味物质,或者生长在污水处理场的活性污泥里,形成稠的絮状泡沫。极端生态环境,如高温、高压、厌氧、低温、酸碱盐及营养贫乏极限等环境中也有放线菌生存。近年的研究结果正为新一代的生物工艺与微生物产品的开发提供新的资源。

海洋:海洋环境作为微生物源药物的发现或探索有 3 个理由,首先地球上 71% 的面积被海洋所覆盖,其深度大多在 2,000m 以上;其次是已经被接受的观点说明,生命是在海洋中进化并形成了最为丰富的生物多样性,实际上 35 个动物门中 20 个门是海洋专性动物,而仅有一个是专性陆生的。这一丰富的海洋生物多样性也同样反映了广泛的化学多样性。第三,海洋环境有着复杂和极端的地质化学及生命起源的生态因素。它是生物共同生活的家园。因此,海洋环境是发现和筛选新的放线菌物种多样性和代谢产物的宝贵资源。近年来,除了在海洋中发现了一些陆生放线菌以外,还发现描述了如 *Salinospora*, *Marinomycetes* 和 *Salinibacterium* 等海栖类放线菌新属(Bull 等 2005; Jensen 等, 2005)。还从 *Salinospora* 分离菌株中发现了高效蛋白体(proteasome)拟制剂 *Salinosporamide A*。从海洋疣孢菌(*Verrucosipora*)的分离菌株中筛选到新的抗肿瘤活性物质 *Abyssomicins*。

植物内生菌:植物内生菌(plant endophytes)一词最早由 Unger (1937) 在研究植物内寄生的病原真菌时使用。随后的研究表明植物内生菌是植物微生态系统中的组成部分,在不同健康植物的根、茎、叶及果实中均生活着微生物的正常菌群。它们的代谢活动及产物可促进宿主植物适应外界各种(生物、非生物)环境压力,维持生态系平衡。迄今的研究表明,植物内生菌可与植物结瘤固氮,产生生长素促进宿主生长,产生抗生素增加植物的抗病性,产生次生代谢活性物质使植物具有抗逆、抗

虫、除草功能。从而，植物内生菌的诸多功能性状成为人们实际利用的新的生物资源。

Igarashi 等 (2000) 从杜鹃花植物中分离到产生马勃吡喃酮 (fistupyrene) 抗真菌物质的链霉菌。Uvidelio 等人 (2002) 从生长在澳大利亚 Northern Territory 的药用植物肯尼迪黑质蛇纹树 (*kennedia nigrescans*) 中分离的内生链霉菌 (*Streptomyces* NRLL 3052) 菌株产生一种具有抗人和植物病原真菌、细菌及寄生虫 (*Plasmodium* sp.) 的广谱抗生素 Munumbicins A, B, C 和 D。Pullen 等 (2002) 将生长在巴西和南非天然生境中的 3 种卫茅科树木 (*Mayt aquifolia* Mart, *Putterlickia retrospinosa* van Wyk and *P. verrucosa*) 分离株鉴定为西唐链霉菌 (*Streptomyces setonii*) 和桑氏链霉菌 (*Streptomyces sampsonii*), 后者产生抗生素氯吡咯 (Chloropyrrole) 和过氯蒽环 (Chlorinaed anthracyclinone)。Chloropyrrole 表现抗多重性耐药细菌和分枝杆菌的高活性。Stamford 等 (2002) 从玉米 (*Maize*) 叶分离到产生高产葡萄糖淀粉酶 (158Umg/L) 的内生链孢囊链霉菌。这种酶为胞外酶, 最高活性在 pH4.5, 70℃。

1.2 物种多样性 由于放线菌的生态多样性, 决定了他为适应多变的环境压力, 发生遗传变异形成的物种多样性。1923 至 1935 年 Bergey's 细菌学鉴定手册的前五版中仅记录了 3 个放线菌属; 而随着人们对放线菌认识及应用的快速发展, 迄今已增加到 170 个属。然而, 它作为原核生物的重要成员, 其已知物种与其估计自然界存在的数量相比仍然是微不足道的 (见表 1)。

表 1 微生物已知描述种与估计自然界存在种的比较 (M. goodfellow 等, 2005)

类群	已知描述种	估计存在种	%
Algae	40,000	350,000	11.0
Bacteria (including cyanobacteria Actinomycetes and unculturables)	5,500	3,000,000	0.1
Fungi (including yeasts, lichen forming fungi, slime moulds, oomycetes)	70,000	1,500,000	5.0
Protozoa (proctotists, excluding algae and oomycete fungi)	40,000	100,000	40.0
Viruses (including plasmids and phages)	5,000	500,000	1.0
总计:	160,500	5,450,000	3.0

1.3 代谢产物多样性 放线菌的生物活性产物主要是它的二级代谢产物。所谓二级代谢产物是指对生长和繁殖不必需的, 而被少数微生物, 如放线菌形成的多种多样的化合物。它们的形成取决于培养条件, 有些二级代谢产物的产生是作为一类密切相关的结构类群。根据 VICURON ANTIBIOTIC LITERATURE DATABASE 的统计, 自 1950 年以来的研究报告和专利显示, 描述的微生物源生物活性代谢产物有 31,600 多种, 其中 20,200 种具有体外活性。最近的 Bear Stearns (www.bearstearns.com/conferences/healthcare2004) 报告称, 已经在市场上和临床实验应用的 800 个微生物源天然化合物中, 其靶标是 57% 抗肿瘤, 9% 抗炎症, 9% 抗感染, 5% 治疗心血管, 4% 治疗糖尿病, 2% 治疗呼吸道。放线菌源的抗生素占整个抗生素的 67% (主要是链霉菌 52% 和稀有放线菌 15%)。而在非抗生素的代谢产物中源于放线菌的也有 40%。

2 化合物的筛选

2.1 筛选路线 美国 Merck 实验室的 W. R. Strohl 博士 (2004) 指出, 在医药工业中分类学分析的应用主要是以分类学的多样性阐述和反映化学的多样性。已经知道的事实是放线菌一个种的不同菌株往往与产生广泛不同的天然产物相关联 (图 1)。一项研究报告表明, 链霉菌的一些种, 如 *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces griseus* 和 *Streptomyces hygroscopicus* 分别产生 13, 32, 46 种不同结构的天然产物。例如 *Streptomyces hygroscopicu* 中的一些菌株可产生 bialophos, hygromycin, spectinomycin, rapamycin 天然化合物。因此, 商业上重要的未知天然产物的发现, 往往是筛选程序中或是新的筛选系统使用了经鉴定为新的微生物菌株。放线菌有着产生新的天然活性物质的极大潜力。近年来越来越多的学者已接受这样一个筛选路线 (M. Goodfellow, 2005), 即:

新放线杆菌 (Novel Actinobacteria) = 新天然产物 (Novel Natural Products) = 商业上的成功 (Commercial Success?)

因此,放线菌的生物多样性与化学多样性间的关联已经被认为是分类学的主要指征,分类学是新药筛选的路线图。

2.2 高通量筛选 高通量筛选是微生物天然代谢产物筛选的自动化程度较高的机器筛选技术。这一技术包括两个主要部分,一是高通量培养(High throughput cultivation)和高通量分析(High throughput Assay)。高通量培养是高通量筛选的关键。仍然要依赖于传统的选择分离程序,需要从好气、异养、pH、温度以及生态等因素考虑分离放线菌。注意排除对目的分离菌株的识别问题。缺乏对新分离菌株的正确鉴定步骤将严重影响高通量筛选的效果。因此,最好建立起一个以放线菌表型数据库为主的筛选平台。这个平台包括:不同生态环境中采样,目的菌株的选择分离,非目的菌株的生态阻遏,分子生态学的探测,环境样品提取 DNA 的分子分析等。高通量分析可考虑有关筛选靶标模型的设计,如 L-胞壁抑制剂检测,胞壁抑制剂的报告基因检测,胞壁抑制剂的 pico Green 检测,蛋白质合成抑制剂检测,RNA 聚合酶抑制剂检测, G⁻ 细菌广谱抑制剂检测,抗真菌项目测定等。检测数据进行信息学分析,获得目的化合物。但近年来的研究报告显示,完全依赖高通量筛选技术尚未获得成功的市场药物。因此,使人们不得不思考如何将传统生物模型筛选技术与高通量筛选相结合的新筛选途径,以提高筛选微生物药物的有效性。

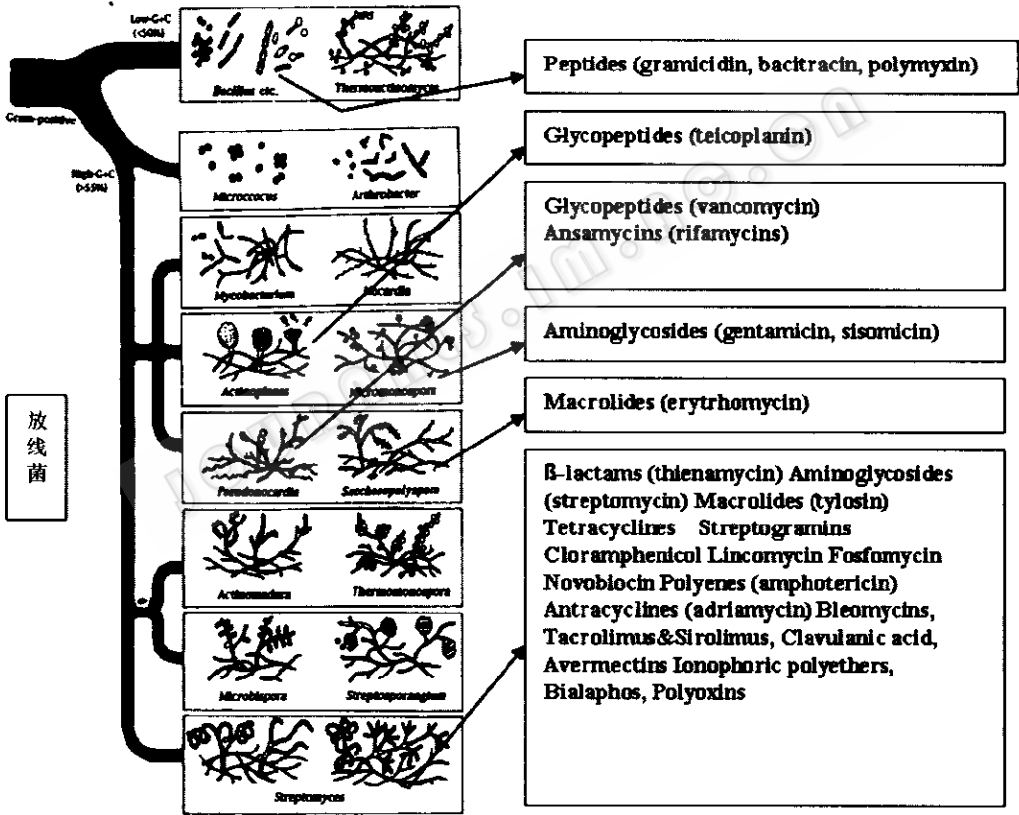


图1 放线菌物种与代谢产物多样性间的关联示意图 (Flavia Marinelli, 2004)

参考文献 (略)