

# 一株新粘细菌生物学性质的研究

李艳利<sup>1</sup> 张荫雷<sup>2</sup> 刘 迎<sup>2</sup> 马中良<sup>2\*</sup>

(1. 南京医科大学生化与分子生物学系 南京 210029)

(2. 上海市能源作物育种及应用重点实验室 上海大学生命科学学院 上海 200444)

**摘 要:** 对粘细菌纤维堆囊菌 *So ce cpu-1* 生物学特性进行了研究。结果表明, 该粘细菌能利用如滤纸或玉米秸秆等纤维素。 *So ce cpu-1* 次级代谢产物的抑菌实验表明, 该粘细菌具有广谱抗菌活性; 对人白血病细胞 K562 有较好的抑制效果。

**关键词:** 粘细菌, 纤维素, 次级代谢产物, 生物活性

## The Bioactivities of a New Myxobacterium

LI Yan-Li<sup>1</sup> ZHANG Yin-Lei<sup>2</sup> LIU Ying<sup>2</sup> MA Zhong-Liang<sup>2\*</sup>

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nanjing University, Nanjing 210029)

(2. Shanghai Key laboratory of Bioenergy crops, School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444)

**Abstract:** The bioactivities of *So ce cpu-1*, a myxobacterium, were investigated. The results showed that the myxobacteria can degrade cellulose and hydrolyze maize stalk about 15.5%. The secondary metabolite from *So ce cpu-1* had broad antimicrobial spectra, and it can inhibit K562, a tumor cell line.

**Keywords:** Myxobacterium, Cellulose, Secondary metabolite, Bioactivities

粘细菌(myxobacteria)是革兰氏阴性菌, 是原核生物中一类特殊的具有复杂多细胞行为的微生物。粘细菌能产生丰富的次级代谢产物, 目前已从粘细菌中发现大约 600 多种生物活性物质, 约占微生物来源总数的 5%。在这些次级代谢产物中发现具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、免疫抑制、抗高血压、抗糖尿病、抗疟疾以及抗高胆固醇症的特性。粘细菌所产生的生物活性物质具有种类繁多、结构新颖、作用层次多、作用机制多样等特点。粘细菌中的抗生素产生菌比例高于放线菌, 有可能成为生物活性物质的新微生物来源<sup>[1,2]</sup>。已经发现的epo系列的抗肿瘤药物, 与传统抗肿瘤药物紫杉醇相比具有更多明显优点<sup>[3]</sup>。一些属的粘细菌能利用纤维素, 对于将

纤维素(农作物废弃物的主要成分)转化为生物燃料提供了新的选择。因此, 粘细菌无论从能源的综合利用还是粘细菌的次级代谢产物在医药工业应用都值得深入研究。本文对分离到的粘细菌 *So ce cpu-1* 从这两个方面做了初步的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和细胞:** 粘细菌 *So ce cpu-1* 由中国药科大学生命科学院赠送。

测试菌株: 受试菌为大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5α)、根霉(*Rhizopus stolonifer*)、毛霉(*Mucor pusillus*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球

菌(*Staphylococcus aureus*)、耐药金黄色葡萄球菌[*Staphylococcus aureus* atcc 29213(耐药菌株)]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、短小杆菌(*Corynebacterium parvum*)、产气杆菌(*Aerobacter aerogenes*)、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)、伤寒杆菌(*Salmonella typhi*)和付乙伤寒杆菌(*Salmonella paratyphi B*)由本校微生物教研室保存。

肿瘤细胞：人白血病细胞 K562 购自上海生化细胞所。

**1.1.2 培养基：**发酵培养基(g/L)：KNO<sub>3</sub> 1.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0, CaCl<sub>2</sub> 1.0, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.2, 酵母提取物 10, 加入放线菌酮(0.1%), pH 7.2。

固体培养基：在发酵培养基中加入 10 g 琼脂/L。

## 1.2 方法

**1.2.1 粘细菌纤维素降解能力的测定：**1) 降解滤纸：将培养基分装于试管中，新华一号滤纸剪成长度约为 0.5 cm×5 cm，将纸条一部分露于培养基液面外。2) 降解玉米秸秆：接种 *So ce cpu-1* 于培养基中，并以不接种的作为空白对照。在培养液中分别加入等量玉米秸秆粉，水解一定时间后，过滤，滤渣烘干称重。减重法测定菌体降解秸秆粉的能力<sup>[4]</sup>。

**1.2.2 粘细菌次级代谢产物的分离：**按刘迎等<sup>[5]</sup>所述方法提取、纯化。

**1.2.3 次级代谢产物抑菌测定：**采用滤纸法<sup>[6]</sup>。在培养皿中倾倒含菌平板，在其中铺置滤纸片，在滤纸片上滴加一定体积次级代谢产物提取液，培养，测量所形成抑菌圈的大小。以吸取相应等体积无菌蒸馏水的滤纸片作为空白对照。

**1.2.4 次级代谢产物的细胞毒实验：**采用 MTT 法<sup>[7]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 测定粘细菌 *So ce cpu-1* 对纤维素水解情况

培养 2 周后，*So ce cpu-1* 可使滤纸变薄，试管底部的滤纸部分崩解。说明 *So ce cpu-1* 可利用纤维素作为碳源，降解滤纸作为碳源供生长利用。

### 2.2 降解玉米秸秆的情况

菌分别接种于 3 mL 加入酵母粉的液体选择培养基中，37℃ 摇床培养 1 d；各取菌液 10% 转接到 25 mL 培养基中，同样 37℃ 摇床培养 20 h；再分别加入精确称取的 2 g 玉米秸秆粉，搅拌成半固体状，

继续 37℃ 培养 1 d；取出培养后的混合物过滤，烘干，称重：秸秆降解了 0.31 g，即降解了 15.5%。

### 2.3 次级代谢产物对细菌的抑菌作用

**2.3.1 对大肠杆菌抑制效果的测定：**取一定体积次级代谢产物用滤纸片吸收，置于涂有大肠杆菌的平板上，培养 36 h。可见吸收次级代谢产物的滤纸(图 1A)周围形成明显的抑菌圈(以抑菌圈的大小表示抑菌的能力)，而对照则没有抑菌作用(图 1B)，说明该菌的次级代谢产物能够抑制大肠杆菌的生长。

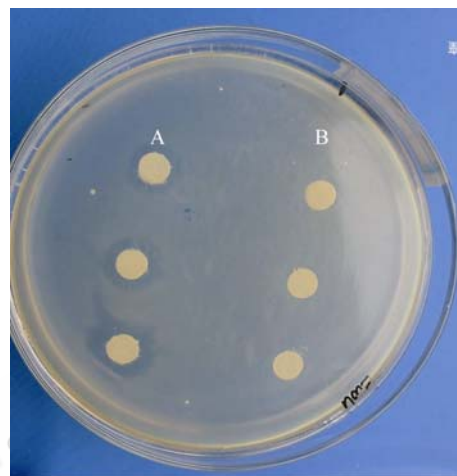


图 1 次级代谢产物对大肠杆菌的抑制

**Fig. 1 Inhibition of *E. coli* by secondary metabolite from *So ce cpu-1***

注：A：吸收次级代谢产物的滤纸片；B：吸收等体积的无菌水的滤纸片

Note: A: Filter papers absorbed secondary metabolite; B: Filter papers absorbed distilled water

由图 1A 看出，随着 *So ce cpu-1* 次级代谢产物量的增加，抑菌圈直径也随之增加(滤纸片吸收的体积由上之下分别为 5 μL、10 μL、15 μL)，抑菌效果更加明显，抑菌圈分别达到 8 mm、10 mm 和 12 mm，显示在一定范围内抑制效果呈浓度依赖性。

**2.3.2 抑菌效果的测定：**利用与测试抑制大肠杆菌同样的方法，测试粘细菌 *So ce cpu-1* 次级代谢产物对其他微生物的抑制情况。抑菌试验结果表明，该菌的次级代谢产物对根霉(图 2A)、毛霉(图 2B)和产气杆菌(图 2C)有明显抑菌效果。

另外，次级代谢产物对其他菌的抑制实验结果表明：对金黄色葡萄球菌、耐药金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、短小杆菌和铜绿假单胞杆菌均有抑制效果，而对伤寒杆菌、付乙伤寒杆菌和百日咳杆菌无抑制作用。

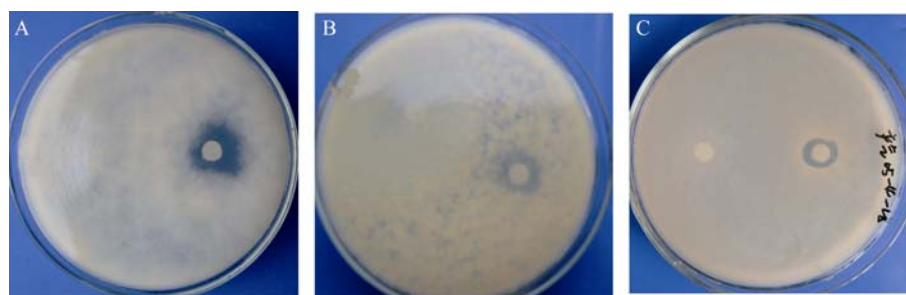


图2 次级代谢产物抑菌效果的测定

Fig. 2 Antimicrobial effect by secondary metabolite from *So ce cpu-1*

注：A：抑制根霉；B：抑制毛霉；C：抑制产气杆菌

Note: A: Inhibit *Rhizopus stolonifer*; B: Inhibit *Mucor pusillus*; C: Inhibit *Aerobacter aerogenes*

## 2.4 次级代谢产物对 K562 细胞的细胞毒作用

由图3可知，粘细菌 *So ce cpu-1* 次级代谢产物在不同用药时间(24 h、48 h、72 h)对 K562 肿瘤细胞均有很好的抑制作用。在药物浓度小于 0.121 mg/mL 时，抑制率随药物浓度的增加而迅速增加，增加幅度十分明显；在药物浓度大于 0.121 mg/mL 时，抑制率随药物浓度增加也呈增加趋势，但增加幅度趋于平缓。从总体来说，粘细菌 *So ce cpu-1* 次级代谢产物对细胞的抑制率随时间增加而增大，抑制效果随浓度的增加而增加。可见粘细菌 *So ce cpu-1* 次级代谢产物对肿瘤细胞毒抑制有明显的时间依赖性。次级代谢产物作用肿瘤细胞后，细胞在形态上出现明显变化，给药 24 h 的结果见图4。

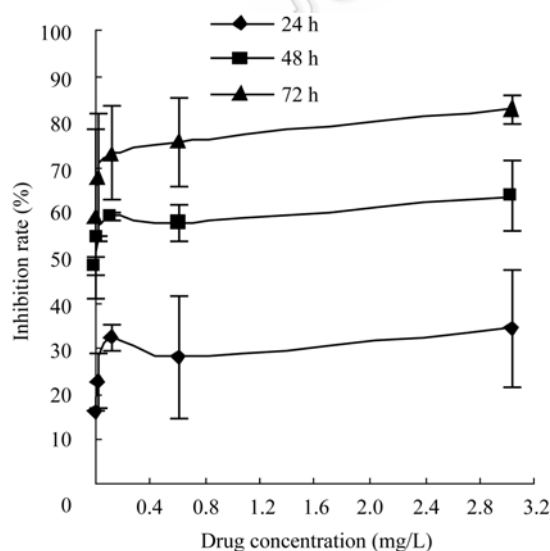


图3 *So ce cpu-1* 次级代谢产物不同作用时间对 K562 细胞的抑制效果

Fig. 3 Time effect on K562 by secondary metabolite from *So ce cpu-1*

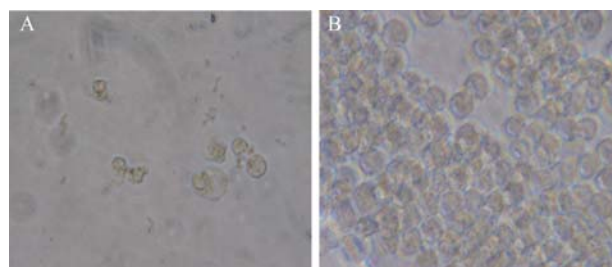
图4 *So ce cpu-1* 次级代谢产物对 K562 细胞的抑制

Fig. 4 Inhibitor of K562 by secondary metabolite from *So ce cpu-1*

注：A：给药组 364 μg/L；B：阴性对照

Note: A: Effect on K562 treated by 364 μg/L drug; B: Control

在给药 24 h 后，肿瘤细胞在形态上有很大变化(图 4A)，细胞萎缩呈小球，黯淡无光泽，数量较稀疏，甚至出现细胞破裂溶出的现象；而对照组细胞饱满、有光泽(图 4B)。

## 3 讨论

能源问题是目前全世界面临的重大课题，而研究表明粘细菌也具有利用纤维素的能力，尤其是嗜纤维素的粘细菌。本文的初步研究结果表明，所分离得到的粘细菌确实能降解玉米秸秆。我们也发现虽然后期降解时间的延长，但是秸秆降解程度却没有明显提高(数据未显示)。这需要我们进一步研究粘细菌降解秸秆的机制，优化降解玉米秸秆条件。

文献中报道的粘细菌次级代谢产物大多都是对真菌有一定的抑制作用，而对细菌特别是革兰氏阴性菌基本没有抑制效果<sup>[8,9]</sup>，而 *So ce cpu-1* 次级代谢产物对革兰氏阳性菌和阴性菌均有很好的抑制效果。在研究 *So ce cpu-1* 次级代谢产物抑制细菌的实验中，发现次级代谢产物对大肠杆菌的抑制效果不

仅明显,而且抑菌效果可维持较长时间。在出现抑菌圈6 d后,抑菌圈仍未消失。文献中报道有关粘细菌代谢物均不能抑制大肠杆菌<sup>[10,11]</sup>,因此粗提物中可能存在新的活性物质。由于该菌次级代谢产物能抑制多种细菌(实验中测试菌大多为病原菌),具有开发新抗生素的前景。另外,一般粘细菌的抑菌效果以毛霉为标志菌进行测试,而我们发现*So ce cpu-1*对根霉的抑制效果更明显(图2A),因此在实验中我们以抑制根霉作为检验的标准。

粘细菌*So ce cpu-1*次级代谢产物对K562细胞有较好的抑制效果,我们对其他的癌细胞SGC7901、Hela、MDA-MB-231和SMMC7721做了抑制试验,结果表明该菌的次级代谢产物对癌细胞具有不同程度的抑制作用(数据未显示)。有文献报道,一些粘细菌次级代谢产物可能引起肿瘤细胞的凋亡。该菌的代谢物具有抗多种肿瘤和细菌活性,今后的工作将是确定该次级代谢产物的化学本质,进行抑菌或抗肿瘤药物的开发研究。

## 参 考 文 献

- [1] 吴斌辉,李越中,胡 玮.纤维堆囊菌活性次级代谢产物的研究进展.微生物学通报,2002,29: 75-78.
- [2] Rachid S, Gerth K, Kochems I, *et al.* Deciphering regulatory mechanisms for secondary metabolite production in the myxobacterium *Sorangium cellulosum* *So ce* 56. *Mol Microbiol*, 2007, 63: 1783-1796.
- [3] Reichenbach H, Höfle G. Discovery and development of the epothilones: a novel class of antineoplastic drugs. *J Antibiot*, 2008, 9: 1-10.
- [4] 杜甫佑,张晓昱,王宏勋.木质纤维素的定量测定及降解规律的初步研究.生物技术,2004,14: 46-48.
- [5] 刘 迎,马中良,王 旻.海滨土壤粘细菌次级代谢产物的性质及产量调控的研究.微生物学通报,2006,33: 42-46.
- [6] 黎晶晶,康银花,王 旻,等.抗MRSA链霉菌NJ0510的抑菌活性及发酵影响因素的研究.药物生物技术,2007,17: 39-42.
- [7] 马中良,刘 迎,黎晶晶,等.粘细菌*So ce cpu-1*的鉴定及其抗肿瘤活性研究.生物技术,2006,16: 32-35.
- [8] Khalil MW, Sasse F, Lunsdorf H, *et al.* Mechanism of action of tubulysin, an antimetabolic peptide from myxobacteria. *Chembiochem*, 2006, 7: 678-683.
- [9] Rachid S, Sasse F, Beyer S, *et al.* Identification of StiR, the first regulator of secondary metabolite formation in the myxobacterium *Cystobacter fuscus* Cb fl7.1. *J Biotechnol*, 2006, 121: 429-441.
- [10] Sasse F, Bohlendorf B, Herrmann M, *et al.* Melithiazols, new beta-methoxyacrylate inhibitors of the respiratory chain isolated from myxobacteria. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot*, 1999, 52: 721-729.
- [11] Gerth K, Bedorf N, Höfle G, *et al.* Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot*, 1996, 49: 560-563.

## 稿件书写规范

### 论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定,计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93执行。单位符号均用英文小写(正体),不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下,希望作者参照执行。

时间:日用d;小时用h;分钟用min;秒用s等表示。

溶液浓度:用mol/L,不用M(克分子浓度)和N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度:用r/min,不用rpm。

蒸汽压力:用Pa或kPa、MPa表示。

光密度:用OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量:蛋白质用D或kD,核酸用bp或kb表示。

图表中数值的物理量和单位:物理量符号采用斜体,单位用正体并用括号括起,例如: $t(h)$ (表示时间,单位是小时)。带数值的计量单位:计量单位不能省略,跟数字之间加一空格( $^{\circ}C$ 和%除外),例如:20 cm × 0.3 cm,不能写成20 × 0.3 cm;3 $^{\circ}C$ ~5 $^{\circ}C$ 不可写成3~5 $^{\circ}C$ ;3%~6%不可写成3~6%等。