

一株具有抗肿瘤活性的海洋放线菌的分离和鉴定

袁献温 杨瑞丽*

(东南大学医学院病原生物学和免疫学系 江苏 南京 210009)

摘要: 海洋放线菌 ACMA006 的发酵产物具有很强的抗肿瘤活性和较好的抑菌效果, 但对人正常细胞毒性较弱。该菌株在大多数培养基上生长良好, 产生可溶性色素; 基质菌丝在培养早期出现横隔, 随后发生断裂; 最适生长温度为 28°C。基于 16S rDNA 序列的系统发育分析表明, 菌株 ACMA006 属于链霉菌属(*Streptomyces*)的成员, 与该属的合格发表种卡伍尔链霉菌华盛顿亚种(*S.cavourensis* subsp. *washingtonensis*)的 16S rDNA 序列相似性最高, 同源性达 100%, 但在部分形态特征和理化特性上存在较大差异。初步确定 ACMA006 属于卡伍尔链霉菌华盛顿亚种的一个海洋变种。

关键词: 抗肿瘤活性, 海洋放线菌, 16S rDNA, 系统发育分析

Isolation and Identification of One Marine Actinomycete Strain Exhibiting Antitumor Activity

YUAN Xian-Wen YANG Rui-Li*

(Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: The fermentation broth of one actinomycete strain ACMA006 strongly inhibited growth of many tumor cells and some microorganisms, but its cytotoxicity to human normal cells were weak. Strain ACMA006 grow well on most tested media, producing exuberant vegetative hyphae and aerial hyphae. Its optimization temperature is 28°C. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequence showed that strain ACMA006 was closely related to one of the genus *Streptomyces* (*S.cavourensis* subsp. *washingtonensis*) with 16S rDNA sequence similarity values of 100%, but had many differences in other features including its morphology, physiological and biochemical characteristics. The preliminary study supported the view that the strain ACMA006 represented a new strain of the *S.cavourensis* subsp. *washingtonensis*.

Keywords: Antitumor activity, Marine actinomycete, 16S rDNA, Phylogenetic analysis

地球表面 70%的面积是海洋, 海洋环境具有高盐、高压、低温、寡营养等特点。在这种特殊的环境中, 海洋微生物形成了独特的代谢途径, 其次生代谢物的化学结构具有极大的复杂性、多样性和高生物活性, 因而成为抗肿瘤活性物质的重要来源。

近十几年来, 已从不同的海洋微生物中分离鉴定了许多结构新颖的抗肿瘤活性物质, 显示出良好的研究开发前景^[1]。

本实验小组从连云港海域获得的样品中分离出近百株的海洋微生物, 从中筛选出具有抗肿瘤活性

基金项目: 江苏省卫生厅课题(No. H200758)

* 通讯作者: ✉ yr1812@sohu.com

收稿日期: 2008-06-17; 接受日期: 2008-09-19

的放线菌 ACMA006, 该菌发酵液对人宫颈癌细胞 (Hela)、肝癌细胞 (7721、HepG2)、大肠癌细胞 (Lovo) 以及小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 等多种肿瘤细胞具有很强的细胞毒性^[2]。为了更好地利用该菌株, 本研究进一步比较了该菌发酵液对肝癌细胞和正常肝细胞细胞毒性的差异, 探讨了该菌株的抑菌作用; 并通过对其 16S rDNA 序列分析, 结合形态特征、培养特征、生理生化特性及细胞壁化学组分等多相分类研究, 确定了该菌株的分类地位。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验用菌及菌株发酵液的制备

放线菌 ACMA006 从连云港海域采集所得的海泥样品分离所得。现已保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会, 专利菌种保藏编号为 CGMCC No. 2027。

将菌株 ACMA006 从斜面培养基接种至液体高氏一号培养基, 28°C、140 r/min 振荡培养 4 d, 按 10% 比例接种至液体 2216E 培养基, 继续培养 6 d, 收集菌株发酵液经超声破碎仪破碎, 离心后过滤灭菌, -20°C 保存, 用于抗肿瘤活性测定及抗菌活性测定, 用时以 RPMI1640 作适当稀释。

1.2 抗肿瘤细胞活性测定

人肝癌细胞 HepG2 和人正常肝细胞 LO2 系本实验室保存细胞。参照文献^[2], 对菌株 ACMA006 发酵液的抗肿瘤活性进行测定。消化收集处于对数生长期的细胞, 制成单细胞悬液, 接种细胞于 96 孔板, 培养 24 h 后加入不同稀释倍数的待测样品, 继续培养 72 h 后加入 MTT, 再培养 4 h, 弃去 MTT, 加入 DMSO, 然后用酶标仪 (BioRad, M550) 测定各孔的吸光值, 设定测定波长为 492 nm。

存活率计算公式如下: 存活率 (%) = $A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}} \times 100$

1.3 抗菌活性测定

参照 Susann Kreitlow 等人的方法^[3], 采用圆形纸片法测定该菌株的抗菌活性。细菌培养基采用普通肉汤培养基。抑菌实验用敏感指示菌: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) 和荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*), 以上菌株由本实验室保存。

在营养肉汁琼脂平板上加 0.1 mL 一定浓度的指示菌悬液, 涂布均匀, 将灭过菌的圆形滤纸片贴在

平板上, 在纸片上加入待测菌株发酵液, 细菌 37°C 培养 16 h~18 h, 其中荧光假单胞菌 28°C 培养 16 h~18 h, 观察结果。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 形态特征: 分别于高氏一号培养基、葡萄糖天门冬素培养基、蔗糖察氏培养基、无机盐淀粉培养基、葡萄糖酵母膏培养基、伊莫松培养基、营养琼脂培养基、甘油牛肉膏蛋白胨培养基 8 种培养基上 28°C 插片培养, 分别于 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、4 d、5 d、6 d、7 d、14 d、21 d、28 d 取出玻片, 用光学显微镜 (Olympus BH-2) 和电子显微镜 (JSM-6390LV) 观察形态。

1.4.2 培养特征和生理生化特征: 根据 Shirling 和 Gottlieb^[4] 的方法观察记录各种培养特征和生理生化特征。将菌株接种于 1.4.1 所述的 8 种培养基上, 分别于第 7 d、14 d、21 d、28 d 观察基质菌丝、气生菌丝、孢子丝以及可溶性色素颜色。

1.4.3 细胞壁化学组成分析: 全细胞水解液化学组分分析按 Stanek 和 Roberts Suzuki^[5] 的方法进行, 枝菌酸组分分析按 Klatt 等^[6] 的方法进行。

1.4.4 16S rDNA 序列测定和系统发育分析: 基因组总 DNA 的提取按微波炉法^[7] 提取, 16S rDNA 序列的扩增参照 Cui 等^[8] 的方法, 16S rDNA 序列的 PCR 扩增使用以下两个引物: Primer A: 5'-ATCCTGGCTCAGGACGAA-3'; Primer B: 5'-GAGGTGATCCAGCGCAC-3'。反应条件: 95°C 预变性 5 min; 95°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 2 min, 共 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物由上海英骏公司测序。测序结果先利用 Blast 软件从 GenBank 与 EMBL 等数据库中调出相关的放线菌的 16S rDNA 序列, 用 Clustal X1.8 软件包排序, 随后用 MEGA3.1 软件进行序列分析, 采用 Neighbour-joining 法^[9] 和 Kimura 双参数校正模型进行系统发育树的构建和同源性比较^[10]。

2 结果与分析

2.1 抗肿瘤活性测定

本实验组以前报道过菌株 ACMA006 的发酵液有较强的抑制肿瘤细胞生长的能力。本研究发现, 该菌株发酵液在有效杀伤肿瘤细胞的同时对正常细胞的毒性较低。当菌株发酵液稀释倍数为 8000 倍时, 肿瘤细胞 HepG2 存活率为 55.1%, 而此时人正常肝细胞 LO2 的存活率为 70.3% (图 1、图 2)。

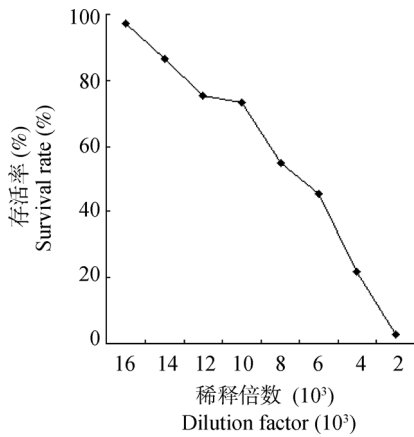


图1 放线菌 ACMA006 发酵液对 HepG2 细胞毒性测定
Fig. 1 The cytotoxicity to HepG2 of fermentation broth of strain ACMA006

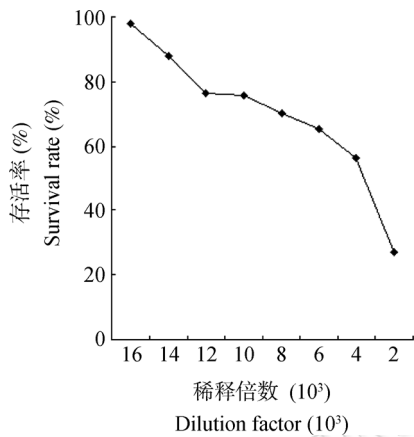


图2 放线菌 ACMA006 发酵液对 LO2 细胞毒性测定
Fig. 2 The cytotoxicity to HepG2 of fermentation broth of strain ACMA006

2.2 抑菌活性

抑菌实验结果表明, 菌株 ACMA006 能抑制革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌的生长, 而对革兰氏阴性细菌大肠埃希氏菌、产气肠杆菌、变形杆菌和荧光假单胞菌没有抑制活性(表 1)。

表 1 抑菌实验结果 Table 1 Results of inhibit experiments	
菌株 Strain	抑菌直径 Inhibit diameters (mm)
<i>Bacillus subtilis</i>	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	11
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-

注: - : 阴性结果。

Notes: - : Negative results.

2.3 菌种鉴定

2.3.1 形态特征: 菌株 ACMA006 基质菌丝与气生菌丝都较发达, 菌丝体直径约为 0.8 μm , 基质菌丝纤细多分枝, 呈网状, 发育较气生菌丝早, 培养 36 h 出现横隔, 第 4 天开始发生断裂(图 3); 孢子丝直或柔曲, 孢子丝以横隔分裂方式形成孢子, 孢子表面光滑, 孢子呈椭圆形或柱形(图 4)。



图3 光学显微镜下菌株 ACMA006 形态特征(400 \times)
Fig. 3 Morphological characteristics of strain ACMA006 by light microscope(400 \times)

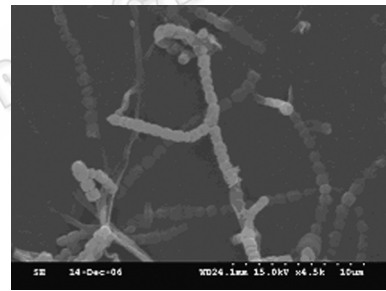


图4 扫描电镜下菌株 ACMA006 孢子丝形态特征(4500 \times)
Fig. 4 Morphological characteristics of strain ACMA006 by scanning electronmicroscope (4500 \times)

2.3.2 培养特征: 菌株 ACMA006 在不同培养基上的培养特征见表 2。该菌株在蔗糖察氏培养基上生长状态较差, 在高氏一号培养基上生长状态良好, 在其他 6 种培养基上生长旺盛。

2.3.3 生理生化特征: 菌株 ACMA006 的生理生化特征见表 3。菌株在 10 $^{\circ}\text{C}$ 以下和 40 $^{\circ}\text{C}$ 以上不能生长, 最适生长温度 28 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.4 细胞壁化学组分分析: 菌株 ACMA006 全细胞水解液含有甘氨酸和 LL-DAP(LL-二氨基庚二酸, Diaminopimelic acid), 细胞壁为 I 型; 全细胞水解液含有葡萄糖和鼠李糖, 不含特征性糖, 糖型为 C; 抗菌酸结果分析显示该菌株细胞壁无枝菌酸。

2.3.5 16S rDNA 序列测定和系统发育分析: 菌株 ACMA006 的 16S rDNA 序列全长为 1507 bp (GenBank 登录号为 EF688620), 将其与 GenBank 等数据

表 2 菌株 ACMA006 的培养特征
Table 2 Cultural characteristic of strain ACMA006

培养基 Medium	基质菌丝 Aerial mycelium	气生菌丝 Substrate mycelium	孢子丝 Spore chain	可溶性色素 Soluble pigment
Gaus, agar	Brown	Soft yellow	White	Yellow-brown
Glucose-asparagine agar	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
Czapek's agar	Yellow	Pale yellow	Pale yellow	Yellow
Inorganic salts-starch agar	Deep yellow	Yellow-brown	White	Yellow
Glucose-yeast extract agar	Deep yellow	Yellow-brown	White	Yellow
Yeast-malt extract agar	Deep yellow	Pale yellow	Pale yellow	Yellow
Nutrient agar	Golden yellow	Pale yellow	Pale yellow	Yellow
Glycerol-malt extract-peptone agar	Deep yellow	Deep yellow	Yellow	Yellow

表 3 菌株 ACMA006 的生理生化特征
Table 3 Physiological and biochemical properties of strain ACMA006

实验项目 Test items	结果 Results	实验项目 Test items	结果 Results
Gram staining	+	Glucose	+
Starch hydrolysis	++	Fructose	+
Nitrate deoxidization	++	xylose	Seldom growth
gelatin liquefaction	-	Sucrose	-
Growth on cellulose	-	Rhamnose	-
Coagulation of milk	+	Arabinose	+
Peptonize of milk	+	Glycerol	sparse
Production of H ₂ S	-	Mannitol	+
Production of melanoid pigment	-	Inositol	-
Optimal temperature	28°C	Sorbitol	-
		Glycerol	+
		Sodium succinate	+

注: ++: 该反应结果很明显; +: 该反应为阳性或能利用该糖; -: 该反应为阴性或不能利用该糖。

Note: ++: Strong positive; +: Positive; -: Negative.

库中的 16S rDNA 序列进行比较, 发现该菌株与合格发表种卡伍尔链霉菌华盛顿亚种(*S. cavourensis* subsp. *washingtonensis*)序列同源性最高, 达到 100%, 卡伍尔链霉菌华盛顿亚种 16S rDNA 序列全长为 1490 bp。通过 ClustalX1.8 进行序列对比, 用 MEGA3.1 软件进行序列分析, 采用 Neighbour-joining 法和 Kimura 双参数校正模型构建系统发育树(图 5), 菌株 ACMA006 与卡伍尔链霉菌华盛顿亚种的进化距离相隔最近。

3 讨论

近年来海洋药物的发展越来越受到世界各国的重视, 海洋微生物抗肿瘤药物成为海洋药物发展中的研究热点。在前期研究中, 我们得到了一株具有较强抗肿瘤活性的海洋放线菌菌株 ACMA006, 该

菌发酵液对 HepG2 等多种肿瘤细胞都具有很强的细胞毒活性。本研究进一步发现: 相对于肝癌细胞 HepG2, 其发酵液对正常肝细胞 LO2 毒性较弱; 并且该菌株能够抑制革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌的生长。

通过对放线菌 ACMA006 的 16S rDNA 序列分析, 结合形态特征、培养特征、生理生化特征及细胞壁化学组分的分析, 参照有关书中的分类标准^[10-14], 可以初步确定该菌株属于链霉菌属。16S rDNA 序列分析表明, 菌株 ACMA006 与合格发表种卡伍尔链霉菌华盛顿亚种(*Streptomyces cavourensis* subsp. *washingtonensis*)具有最大的序列同源性, 同源性达到 100%。但是其形态特征和生理生化特征与卡伍尔链霉菌华盛顿亚种有些差异: 菌株 ACMA006 在培养基上能形成黄色或浅黄色可溶性

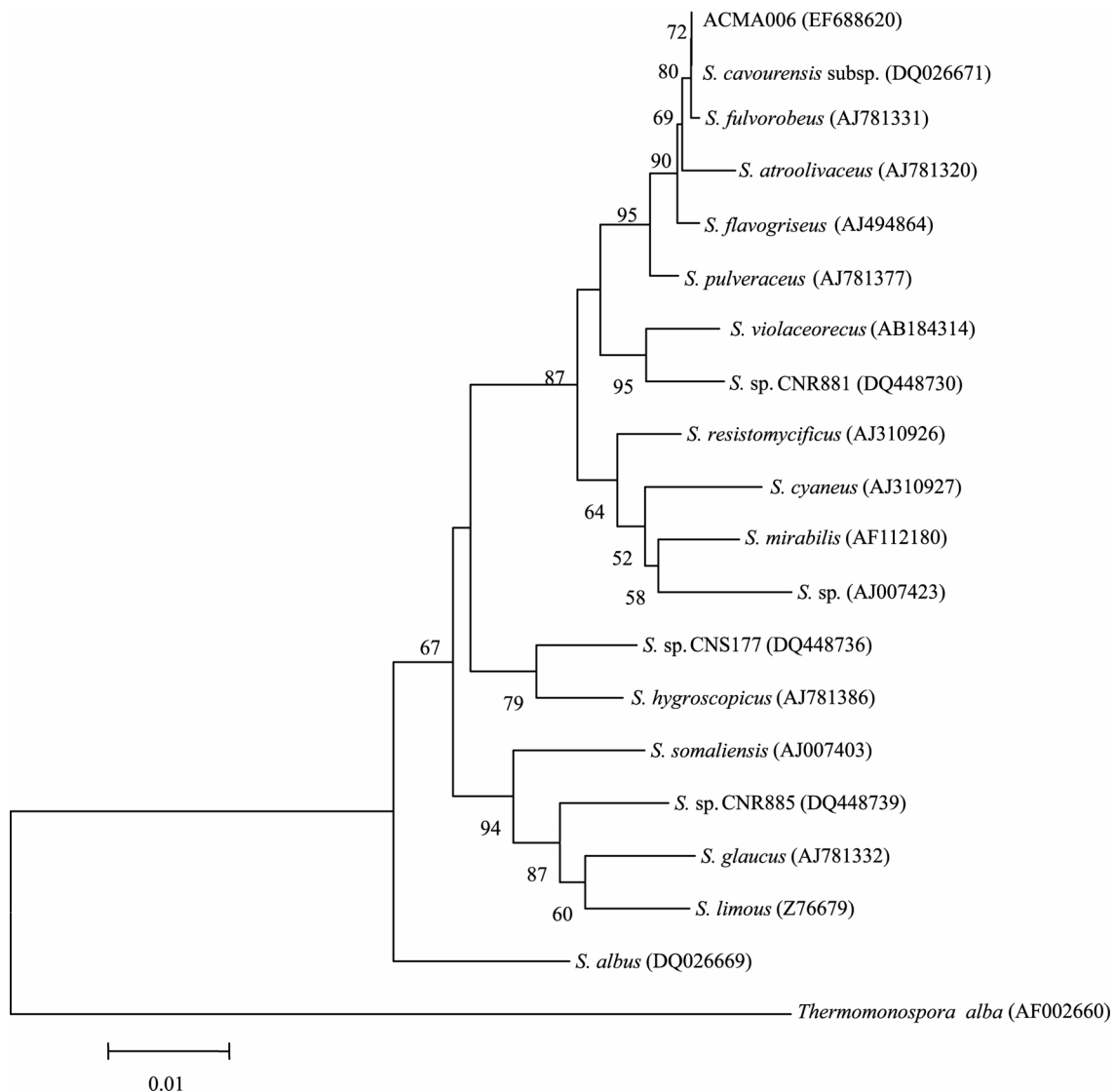


图5 菌株 ACMA006 及其从 GenBank 等数据库中调集的相关属种构建的以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树状关系图

Fig. 5 Neighbor-Joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among ACMA006 and other related strains downloaded from GenBank and EMBL *et al*

注：分支上的树值为自举 1000 次的结果，线段 0.01 代表 1/100 进化距离单位。

Note: Nuerals on branches are the supporting percentage by 1000 replicates (Scale bar, 0.01 nucleotide substitution per 100 nucleotides of 16S rDNA sequence).

色素，不能产生黑色素和 H_2S ；卡伍尔链霉菌华盛顿亚种无可溶性色素，能产生黑色素和 H_2S 。此外，ACMA006 基质菌丝在培养早期有横隔、随后出现断裂现象，形态上近似诺卡氏菌型放线菌 (*Nocardioform Actinomycetes*)，在链霉菌属内还是少见，我们在《链霉菌鉴定手册》上只查到淤泥链霉菌有基质菌丝断裂现象^[15]。实验还发现，菌株 ACMA006 在天然海水培养基中的抗肿瘤活性远高于淡水培养基，该菌株合成抗肿瘤活性物质对海水有较强的依赖性，可能是陆地微生物在海洋环境中

发生进化变异的结果。综合上述鉴定结果，我们初步确定该菌株属于链霉菌属，是卡伍尔链霉菌华盛顿亚种的海洋变种。但要最终确定其分类地位，还要进一步结合该菌株与其它典型菌株之间的 DNA - DNA 杂交实验来确定。

目前，该菌株发酵液中抗肿瘤活性物质的分离、纯化及结构鉴定等研究正在进行中，将另文报道。

致谢：本教研室的林玲老师，中国科学院微生物研

研究所放线菌分类研究室刘志恒老师等对本文的部分工作给予了很多帮助, 谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] 曹 雪, 杨瑞丽. 源于海洋微生物抗肿瘤活性物质的研究. 药物生物技术, 2007, **14**(4): 302–305.
- [2] 杨瑞丽, 袁献温, 郑 杰, 等. 一株海洋放线菌发酵液抗肿瘤活性初探. 台湾海峡, 2007, **26**(3): 351–355.
- [3] Susann Kreitlow, Sabine Mundt, Ulrike Lindequist. Cyanobacteria—a potential source of new biologically active substances. *Journal of Biotechnology*, 1999, **70**: 61–63.
- [4] Shirlinge B, Gittlieb D. Methods for characterization of streptomycetes species. *Int Syst Bacteriol*, 1966, **16**: 313–340.
- [5] Stanek JL, Roberts GD. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin layer chromatography. *Appl Microbiol*, 1974, **28**: 226–231.
- [6] Klatte S, Ktoppenstedt M, Raineyf A. *Rhodococcus opacus* sp nov, an unusual nutritionally versatile *Rhodococcus* species. *Syst Appl Microbiol*, 1994, **17**: 355–360.
- [7] Orsini M, Romanos V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, **33**(1): 17–20.
- [8] Cui XL, Mao PH, Zeng M, et al. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Nocardioseae*. *Int J Sys Evol Microbiol*, 2001, **51**: 357–363.
- [9] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**: 406–425.
- [10] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学——原理、方法及实践. 北京: 科学出版社, 2007, pp.150–201.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.62–64.
- [12] RE 布坎南, NE 吉布斯等. 伯杰细菌鉴定手册. 第九版. 北京: 科学出版社, 1994.
- [13] 张继忠. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990, pp.111–155.
- [14] 阎逊初. 放线菌的分离与鉴定. 北京: 科学出版社, 1992.
- [15] 中国科学院微生物所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1975.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。