



研究报告

四株虫生真菌的鉴定及其醇提取物对 Hela 细胞的抑制作用

唐鱼 孟云 王敦* 冯纪年*

西北农林科技大学植物保护学院 陕西 杨凌 712100

摘要:【背景】虫生真菌是非常重要的自然资源,但被发现和利用的种类相对较少。【目的】鉴定从野外采集的4株虫生真菌,并探讨4株菌的醇提取物对宫颈癌 Hela 细胞的抑制活性。【方法】结合形态学特征与 rDNA ITS 和 β -Tubulin 序列分析对4株虫生真菌进行种类鉴定,采用四甲基偶氮唑盐 [3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2-H-Tetrazolium Bromide, MTT] 比色法分析它们的菌丝醇提取物(M-1、M-2、M-3、M-4)和发酵液醇提取物(F-1、F-2、F-3、F-4)对 Hela 细胞增殖的抑制活性,并进一步利用细胞形态学观察和流式细胞术检测所筛选抑制作用最强的醇提取物的抑制活性。【结果】经鉴定,菌株 IS 和 LS 均为环链棒束孢(*Isaria cateniannulata*),菌株 HLS 和 HLS2 均为粉棒束孢(*Isaria farinosa*); MTT 实验结果显示8种醇提取物对 Hela 细胞增殖均有一定的抑制作用,而且菌丝醇提取物和发酵液醇提取物的抑制作用大小排序均为:粉棒束孢 HLS>环链棒束孢 LS>粉棒束孢 HLS2>环链棒束孢 IS,其中,粉棒束孢 HLS 的发酵液醇提取物 F-3 的抑制活性最强($P<0.001$),处理 24 h 后其 IC_{50} 值为 0.667 8 mg/mL,而其他7种醇提取物的 IC_{50} 值均大于 1 mg/mL;细胞形态学观察显示 F-3 在处理时间 24 h 时,对 Hela 细胞生长的抑制作用随着浓度的增加而加大,而对正常细胞 BHK-21 仅有轻微的毒性作用;流式细胞仪检测发现 F-3 可诱导 Hela 细胞凋亡,当处理浓度为 1.0 mg/mL 时,细胞总凋亡率可达到 32.45%。【结论】4株菌对 Hela 细胞增殖的抑制作用存在着显著差异,这可能与4株菌的地理来源、寄主等因素有关;来源于粉棒束孢 HLS 株系的发酵液醇提取物 F-3 对正常细胞 BHK-21 的增殖和生长无显著抑制作用,但对 Hela 癌细胞的增殖和生长抑制活性最强,而且具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用,暗示其具有研究利用价值。

关键词: 虫生真菌,乙醇提取物, Hela 细胞,抑制作用

Identification of four entomogenous fungi and the inhibitory effect of their ethanol extracts on Hela cells

TANG Yu MENG Yun WANG Dun* FENG Jinian*

College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

Abstract: [Background] The entomogenous fungi were important resources from the nature, but few of

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31670659)

*Corresponding authors: Tel: 86-29-87092090

E-mail: WANG Dun: dunwang@foxmail.com; FENG Jinian: jinianf@nwsuaf.edu.cn

Received: 23-03-2020; **Accepted:** 09-06-2020; **Published online:** 30-07-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31670659)

*通信作者: Tel: 029-87092090

E-mail: 王敦: dunwang@foxmail.com; 冯纪年: jinianf@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2020-03-23; 接受日期: 2020-06-09; 网络首发日期: 2020-07-30

them were found and utilized comparatively. **[Objective]** To identify four entomogenous fungi collected from the field, and to explore the inhibitory effect of their ethanol extracts on Hela cells. **[Methods]** Four entomogenous fungi were identified by morphological characteristics, rDNA ITS and β -tubulin sequence analysis. The inhibitory effect of ethanol extracts from mycelium (M-1, M-2, M-3, M-4) and ferment liquid (F-1, F-2, F-3, F-4) on Hela cell proliferation were analyzed by MTT assay. The inhibitory activity of the ethanol extract with the strongest inhibitory effect was detected by cell morphological observation and flow cytometry. **[Results]** After identification, strains IS and LS are *Isaria catenianulata*, strains HLS and HLS2 are *Isaria farinosa*. The results of MTT showed that eight kinds of ethanol extracts inhibited the proliferation of Hela cells to some extent, and the order of inhibitory effect of ethanol extracts from mycelium and ferment liquid was *Isaria farinosa* HLS>*Isaria catenianulata* LS>*Isaria farinosa* HLS2>*Isaria catenianulata* IS, of which F-3 had the strongest inhibitory activity ($P<0.001$), and its IC_{50} value was 0.667 8 mg/mL after 24 hours of treatment, while the IC_{50} value of the other seven ethanol extracts were higher than 1 mg/mL. The cell morphological observation showed that the inhibitory effect of F-3 on Hela cell growth increased with the increase of the concentration when Hela cells were treated with F-3 for 24 h, however. F-3 has only slight toxic effect on BHK-21 cells; flow cytometry showed that F-3 could induce apoptosis of Hela cells, and the total apoptosis rate could reach 32.45% when the treatment concentration was 1.0 mg/mL. **[Conclusion]** The inhibitory effect of four entomogenous fungi on Hela cell proliferation is significantly different, which may be related to the geographical origin and host of four entomogenous fungi. F-3 ethanol extract from *Isaria farinosa* has no significant inhibitory effect on the proliferation and growth of BHK-21 cells, but has the strongest inhibitory effect on Hela cells proliferation and growth and has the effect of inducing tumor cells apoptosis, suggesting that it has the further research value.

Keywords: entomogenous fungi, ethanol extract, Hela cells, inhibitory effect

虫生真菌(Entomogenous Fungi)是指寄生在昆虫上并在其体内增殖而引起昆虫患病或死亡的一类真菌。在虫生真菌中,虫草属(*Cordyceps*)真菌是一个大类群,全世界虫草真菌有 1 000 余种,我国目前共报道约 120 种,因此虫草属在虫生真菌中占有重要的地位^[1-2]。虫草是广义虫草属(*Cordyceps sensu lato*)中所有真菌的总称,不仅包括冬虫夏草(*Ophiocordyceps sinensis*)、蛹虫草(*Cordyceps militaris*)、蝉花(*Cordyceps cicadae*)、广东虫草(*Cordyceps guangdongensis*)等重要的药用菌,也包括部分已被证明为虫草的无性型种类绿僵菌(*Metarhizium* spp.)、白僵菌(*Beauveria* spp.)、棒束孢(*Isaria* spp.)等重要的生防菌^[3-5]。虫生真菌作为宝贵的生物资源,含有虫草素、虫草酸、腺苷及虫草多糖等多种活性成分,具有营养、保健和医疗的药用功效。特别是在抗肿瘤活性方面,国内外开展了大量的研究。例如:谢飞等^[6]对野生蝉花多糖的

研究发现,其在 Hela 细胞模型和移植性荷瘤小鼠模型上均显示具有较强的抗肿瘤活性;陈安徽等^[7]报道了人工培育蝉花虫草对卵巢肿瘤细胞有明显的抑制作用,并成功分离到 2 种化合物,其中一种为虫草素;Xi 等^[8]和 Park 等^[9]对蛹虫草的研究发现,其提取物对白血病细胞 Jurkat、K562 以及大鼠 C6 胶质瘤细胞均有很好的抑制效果,这些研究都表明虫生真菌来源的活性成分是抗癌药物开发的理想材料。

宫颈癌是常见的女性生殖道恶性肿瘤之一,中国每年的宫颈癌死亡人数约 5.3 万,约占当年全部女性恶性肿瘤死亡人数的 18.4%,可见宫颈癌严重威胁着我国女性健康与生命^[10-11]。虫草菌作为一种重要的药用真菌,已报道对包括宫颈癌、肺癌、乳腺癌和胃癌在内的多种恶性肿瘤表现出良好的抑制作用^[12]。我国拥有丰富的虫生真菌资源,然而目前开发利用的仅有冬虫夏草、蛹虫草、蝉花和广

东虫草等极个别的种类,大量的天然虫生真菌资源还有待挖掘利用。因此,本实验就以从野外采集的虫尸上分离纯化的 4 株虫生真菌为材料,利用形态学特征和分子生物学方法开展种类鉴定工作,并研究其醇提物体外抑制宫颈癌 HeLa 细胞的活性,分析比较 4 株虫生真菌对癌细胞抑制活性的差异,筛选出抑制活性最强的醇提物,为更好地挖掘虫生真菌资源、开发相关保健品和抗癌药物提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株及细胞

4 株虫生真菌是从野外采集的虫尸上分离纯化获得,现保存于西北农林科技大学植物保护学院昆虫与微生物资源利用实验室菌种库,相关信息见表 1;人宫颈癌细胞株 HeLa 和乳仓鼠肾细胞株 BHK-21 由西安交通大学医学院提供。

1.1.2 主要试剂、仪器和培养基

1640 细胞培养基、胎牛血清 FBS, HyClone 公司;胰酶, Amresco 公司;细胞凋亡检测试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;青霉素、链霉素、二甲基亚砷(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)、噻唑蓝 [3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2-H-Tetra Zolium Bromide, MTT]、5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil,

5-Fu), 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;葡萄糖、蛋白胨、酵母浸出粉、琼脂、95%乙醇、石油醚,国药集团化学试剂有限公司;引物由西安擎科泽西生物科技有限公司合成。

台式高速离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;高速多功能粉碎机,上海市久品工贸有限公司;超声波清洗器,昆山禾创超声仪器有限公司;旋转蒸发仪、减压抽滤装置、真空冷冻干燥机,青岛永合创信电子科技有限公司;CO₂细胞培养箱,力康生物医疗科技控股有限公司;多功能酶标仪, Tecan 公司;倒置显微镜, Olympus 公司;流式细胞仪, Beckman 公司。

SDAY/4 培养基(g/L): 酵母浸出粉 2.5, 葡萄糖 10.0, 蛋白胨 2.5, 琼脂(固体) 20.0。

1.2 菌株形态学观察

将分离纯化的 4 株菌接种于 SDAY/4 固体培养基平板和 200 mL 培养瓶中,然后将平板和培养瓶置于 15 °C 恒温生化培养箱中分别培养 30 d 和 60 d,观察菌株在平板和培养瓶中的生长特征,包括菌落形态、菌丝颜色、孢梗束等。采用透明胶带粘贴法进行标本片制作,对菌株进行显微形态特征观察,主要包括菌株的菌丝生长特征、产孢结构类型、孢子形状及大小等。参考《中国真菌志·第 43 卷》^[13]中的检索表对 4 株菌进行初步鉴定。

表 1 供试 4 株虫生真菌的信息

Table 1 The information of four entomogenous fungi

菌株编号 Strain No.	寄主 Host insect	物种 Species	采集地 Collecting localities	纬度 Latitude	经度 Longitude
IS	蝙蝠蛾 <i>Hepialus</i> spp.	<i>Isaria</i> spp.	青海省玉树市 Yushu city, Qinghai province	N32°58'40.70"	E97°02'26.13"
LS	大青叶蝉 <i>Cicadella viridis</i>	<i>Isaria</i> spp.	四川省乐山市 Leshan city, Sichuan province	N29°30'25.89"	E103°48'7.83"
HLS	沫蝉科 <i>Cercopidae</i>	<i>Isaria</i> spp.	陕西省安康市平利县化龙山 Hualong mountain, Pingli county, Ankang city, Shaanxi province	N32°01'40.32"	E109°22'8.75"
HLS2	圆蝽科 <i>Plataspidae</i>	<i>Isaria</i> spp.	陕西省安康市镇坪县上竹镇 Shangzhu town, Zhenping county, Ankang city, Shaanxi province	N31°54'51.10"	E109°26'48.89"

1.3 DNA 提取、PCR 扩增及测序

将 4 株菌接种于含有 SDY/4 液体培养基的 500 mL 锥形瓶中, 然后放置在摇床 25 °C、150 r/min 条件下培养 6–8 d, 用 3 层无菌医用纱布过滤收集菌丝体, 再用灭菌的滤纸将菌丝体表面的水分吸干, 然后按照 Masoudi 等^[14]描述的方法提取菌株总 DNA。以提取的 4 株菌的基因组 DNA 作为模板, 采用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[15] PCR 扩增 rDNA ITS 基因, 采用 T12 (5'-TAACAAGTCTGGGCCAAGGGTCAC-3')和 T22 (5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3')^[16] PCR 扩增 β -Tubulin 基因。PCR 反应体系(25 μ L): ddH₂O 17.7 μ L, 10 \times PCR Reaction Buffer 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, 0.1% BSA

0.3 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, DNA 模板 1.0 μ L。rDNA ITS 基因的 PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。 β -Tubulin 基因的 PCR 反应条件: 94 °C 30 s; 94 °C 1 min, 52 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。用 1% 琼脂糖胶检测 PCR 扩增产物, 目的条带切胶纯化后送往西安擎科泽西生物科技有限公司进行测序。

1.4 序列比对和系统发育分析

获得的 4 株菌的 ITS 和 β -Tubulin 序列经手工校对后, 于 GenBank 进行比对和注册序列登录号, 并在 GenBank 数据库中下载相似性较高的 rDNA ITS 和 β -Tubulin 序列, 联合两基因序列进行系统发育分析(表 2)。以冬虫夏草菌株 *Ophiocordyceps sinensis* Strain DCXC8 作为外群, 按照 Masoudi

表 2 用于两基因系统发育分析的来自 GenBank 中的菌株及序列登录号

Table 2 The strains and accession numbers' information of two genes from GenBank

物种 Species	菌株编号 Strain No.	基因序列 GenBank 登录号 GenBank accession No.	
		ITS	β -tubulin
<i>Isaria</i> spp.	IS	MK975999	MK991777
<i>Isaria</i> spp.	LS	MK976000	MK991778
<i>Isaria</i> spp.	HLS	MK976001	MK991779
<i>Isaria</i> spp.	HLS2	MK976002	MK991780
<i>Paecilomyces farinosus</i>	Strain RCEF673	AF368784	–
<i>Isaria farinosa</i>	Strain J5	KC242660	KC242755
<i>Isaria farinosa</i>	Isolate HNDR8-2	KY646428	–
<i>Isaria fumosorosea</i>	Strain CHE-CNRCB 393	KT225594	KT225603
<i>Isaria fumosorosea</i>	Strain ARSEF 2679	EU553330	–
<i>Isaria javanica</i>	Voucher CHE-CNRCB 303	KM234212	KT225604
<i>Isaria javanica</i>	Voucher CHE-CNRCB 305	KM234214	KT225605
<i>Paecilomyces cateniobliquus</i>	Strain CBS 153.83	AY624173	AY624212
<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	Strain DCXC8	MF403011	–
<i>Cordyceps pruinosa</i>	Strain ARSEF 5413	JN049826	DQ522515
<i>Cordyceps cicadae</i>	Strain GZU1205241	KJ173474	–
<i>Cordyceps scarabaeicola</i>	Strain ARSEF 5689	JN049827	DQ522496
<i>Paecilomyces cateniannulatus</i>	Strain CBS 152.83	AY624172	AY624211
<i>Paecilomyces cateniannulatus</i>	Strain GZUIFR-zy.7	EU363506	–
<i>Isaria tenuipes</i>	Strain J2	KC242658	KC242753
<i>Isaria tenuipes</i>	Strain OSC 111007	–	DQ522513
<i>Isaria cateniannulata</i>	Isolate IYYC-02	MG345088	–
<i>Isaria cateniannulata</i>	Isolate ILDS-03	MG345094	–

注: –: 未知

Note: –: Unknown

等^[14]描述的方法, 采用最大似然法(Maximum Likelihood, ML)构建系统发育树。

1.5 醇提物制备

1.5.1 菌丝及发酵液收集

依据预实验中多次重复发酵提取、MTT 法测定不同菌株醇提物抑制宫颈癌细胞 HeLa 的活性, 确定的最优发酵条件为: SDY/4 液体培养基; 25 °C、150 r/min 条件下培养 10 d。在预实验基础上, 将 4 株菌分别接种到 SDY/4 液体培养基中, 置于摇床按最优条件培养, 随后在 8 000 r/min 条件下离心 15 min 分离菌丝和发酵液, 用于后续醇提物的制备。

1.5.2 菌丝醇提物制备

根据裴晓亚^[17]提到的醇提方法, 将收集的菌丝 60 °C 烘干, 使用高速多功能粉碎机将干燥菌丝粉碎成末状, 然后用 50 倍量的 95%乙醇将其浸泡 24 h, 在这过程中每隔 6 h 搅拌一次浸泡液, 静置沉淀 6 h 后收集提取液, 重复上述过程, 直至提取液无颜色为止。合并收集到的提取液, 经过 0.09 MPa、50 °C 的减压浓缩和真空冷冻干燥后获得不同菌株的菌丝醇提物(表 3)。

1.5.3 发酵液醇提物制备

根据裴晓亚^[17]和杜松等^[18]提到的醇提方法, 发酵液先经 2 层 11 cm 双圈定性滤纸抽滤 3 次后收集, 然后将发酵液旋转蒸发至一定体积后根据 $V_{乙醇} = V_{发酵液} \times 80\%$ 的公式计算加入 95%乙醇的量, 采用超声破碎提取法(150 W/40 kHz)提取 2 h, 后放入 4 °C 冰箱静置 12 h, 抽滤得到乙醇提取液, 经过 0.09 MPa、50 °C 的减压浓缩和真空冷冻干燥后得到不同菌株的发酵液醇提物(表 3)。同时, 为

了排除液体培养基的本底差异, 同样按照上述的方法制备未培养菌株的 SDY/4 培养液的醇提取物。为了方便后文的描述, 将制备的 4 种菌丝醇提物和 4 种发酵液醇提物分别命名(表 3)。

1.6 醇提物对宫颈癌细胞 HeLa 和正常细胞 BHK-21 增殖的抑制作用

1.6.1 细胞培养

将宫颈癌细胞 HeLa 和乳仓鼠肾细胞 BHK-21 培养在含有 10%胎牛血清、100 μg/mL 青霉素、50 μg/mL 链霉素的 1640 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 以及饱和湿度培养箱内培养, 细胞培养液的更换频率应基于细胞生长状态每隔 1-2 d 更换一次, 细胞铺至 80%-90%时按 1:3 进行传代接种, 选取生长状态良好、增殖旺盛和细胞数量呈指数递增的对数期细胞进行实验。

1.6.2 MTT 实验

采用 MTT 法^[19-21]测定比较 8 种醇提物抑制宫颈癌细胞 HeLa 的活性。首先将 HeLa 细胞密度调整为 1×10^5 个/mL, 以每孔 200 μL 细胞悬液接种于 96 孔板。另外, 在 96 孔板外围一周各孔加入 200 μL 无菌 PBS, 置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度下培养 24 h。待细胞贴壁后, 吸弃旧培养液, 每孔加入 200 μL 用新鲜培养基配制成的 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mg/mL 的发酵液醇提取物, 每个浓度设置 5 个重复, 同时设置空白对照组(调零孔)和不含药物培养基的阴性对照组(0 mg/mL)。继续培养 24 h 后, 吸弃培养基, 每孔加入 MTT (5 mg/mL) 20 μL, 继续培养 4 h 后吸除 MTT, 每孔避光加入 150 μL DMSO, 在 37 °C、120 r/min 条件下振荡 15 min, 直至蓝紫色甲瓚结晶充分溶解。用酶标仪测定在以参比波长为 630 nm、检测波长为 570 nm 条件下每孔的吸光度(OD 值), 计算细胞活性抑制率和半数抑制浓度(IC₅₀), 实验重复 3 次。同时, 设置用新鲜培养基配制成的 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mg/mL 的 SDY/4 培养液醇提取物处理 HeLa 细胞 24 h 作对照, 以排除液体培养基的本底差异, 实验重复 3 次。用如下公式计算各处理组的细胞活性抑制率:

表 3 8 种醇提物简称

Table 3 Eight ethanol extracts abbreviation

菌株编号 Strain No.	IS	LS	HLS	HLS2
菌丝醇提物 Mycelium ethanol extract	M-1	M-2	M-3	M-4
发酵液醇提物 Ferment liquid ethanol extract	F-1	F-2	F-3	F-4

细胞活性抑制率(%)=[1-($OD_{\text{处理组}}-OD_{\text{空白对照组}}$)/($OD_{\text{阴性对照组}}-OD_{\text{空白对照组}}$)] \times 100。

采用 GraphPad Prism 7.0 软件计算 IC_{50} 值。通过以上 MTT 实验筛选出抑制作用最强的醇提物,接着在处理时间 48 h、处理浓度(0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)条件下,继续通过 MTT 实验检测所筛选抑制作用最强的醇提物对宫颈癌细胞 HeLa 和正常细胞 BHK-21 增殖和生长的影响,同时设置抗癌药物 5-氟尿嘧啶(5-Fu)作为阳性对照,实验重复 3 次。

1.7 细胞形态学观察

将处于对数生长期的 HeLa 和 BHK-21 细胞吹打下来,制成单细胞悬液,分别接种在 3.5 cm 细胞培养皿中,每皿加入 2 mL 细胞悬液,细胞密度为 1×10^5 个/皿。贴壁 24 h 后吸弃旧培养基,每孔加入 2 mL 的 0、0.5 和 1.0 mg/mL 在 MTT 实验中筛选出的抑制作用最强的醇提物,继续于培养箱中培养 24 h。将培养皿置于倒置显微镜下观察两者细胞形态变化。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡

将处于对数生长期的 HeLa 细胞用胰酶消化后制成单细胞悬液,接种于 6 孔板中,每孔加入 2 mL 细胞悬液,细胞密度控制在 1×10^6 个/皿。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后吸弃旧培养基,每孔加入 2 mL 的 0.2、0.6 和 1.0 mg/mL 抑制作用最强的醇提物,同时设置不加药物的培养基作为阴性对照(0 mg/mL),每个处理组设置 3 个重复,继续置于培养箱中处理 24 h。然后把细胞培养液移至 2 mL 离心管内,用 PBS 洗涤细胞一次,加入 0.5 mL 胰酶消化细胞,室温下孵育至轻轻吹打可以使细胞吹打下来时,吸出胰酶消化液。加入收集的细胞培养液,把细胞轻轻吹打下来,转移至 2 mL 离心管内,1 000 \times g 离心 5 min,弃上清。用 1 mL PBS 重悬细胞,1 000 \times g 离心 5 min,弃上清,在避光条件下,先加入 500 μ L 的 1 \times Binding Buffer,然后再加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI 轻摇混匀,室温避光

孵育 15 min。样品上机检测前用 300 目尼龙网过滤,样品需在 1 h 内用流式细胞仪完成细胞凋亡检测。使用 CytExpert 软件进行数据分析。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计学分析,数据以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD) ($n=3$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用 One-Way ANOVA 检验, P 值表示为 $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**), $P<0.001$ (***)。采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 4 株虫生真菌形态学鉴定

菌株 IS 和 LS 在平板上 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 30 d,菌落直径 50–55 mm,菌落正面均为白色,隆起,绒毛状,菌落背面均为白色(图 1A、1B、1E、1F);菌丝均分隔,透明,光滑,宽 0.5–1.2 μ m;分生孢子梗(10.0–14.0) μ m \times (1.5–2.0) μ m,其上着生有由 2–4 个瓶梗组成的轮生体分枝,瓶梗基部椭圆形或柱状膨大,上部变细为明显的颈部,(7.0–10.0) μ m \times (1.2–3.0) μ m(图 1I、1J);分生孢子透明,光滑,椭圆形或近球形,(2.0–5.0) μ m \times (1.5–2.0) μ m,常排列成叠瓦状斜链或聚集成环状(图 1M–1Q);在培养瓶中延长培养至 60 d,菌株 LS 产生白色的孢梗束,菌株 IS 未见孢梗束(图 2A、2B、2E、2F)。

菌株 HLS 和 HLS2 在平板上 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 30 d,菌落直径 45–60 mm,稀疏绒毛状,中部淡黄色,边缘白色,背面为橙黄色(图 1C、1D、1G、1H);菌丝均分隔,宽 0.6–2.7 μ m;分生孢子梗长,不规则分枝,(50.0–100.0) μ m \times (1.1–2.5) μ m,其上着生有由 2–4 个瓶梗组成的轮生体分枝,瓶梗基部拟椭圆形膨大,上部逐渐变得细长,(5.0–15.0) μ m \times (1.4–2.5) μ m,颈长约 1.8 μ m(图 1K、1L);分生孢子透明,光滑,长椭圆形至椭圆形,也有卵圆形,(1.8–3.0) μ m \times (1.0–2.2) μ m(图 1R–1T);在培养瓶中延长培养至 60 d,菌株 HLS 和 HLS2 均产生淡黄色的孢梗束,其上部可见大量的分生孢子(图 2C、2D、2G、2H)。

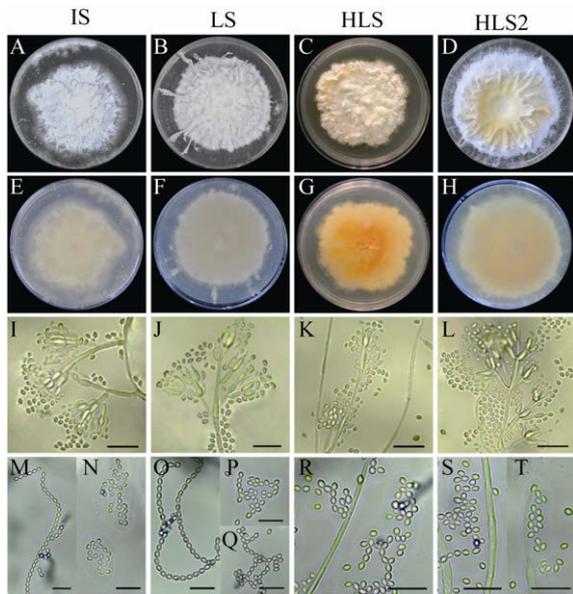


图 1 4 株虫生真菌平板培养形态及显微形态特征
Figure 1 The characteristics and microscopic features of four entomogenous fungi

注: A-D: 菌落正面; E-H: 菌落背面; I-L: 产孢结构; M-T: 孢子形态。标尺=10 μm

Note: A-D: Front colony; E-H: Reverse colony; I-L: Conidiogenous structures; M-T: Conidias morphology. Bars=10 μm

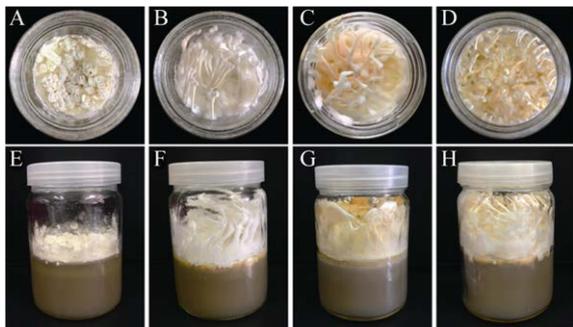


图 2 4 株虫生真菌培养瓶中的形态特征
Figure 2 The characteristics of four entomogenous fungi in culture bottles

注: A、E: IS 菌株; B、F: LS 菌株; C、G: HLS 菌株; D、H: HLS2 菌株

Note: A, E: IS strain; B, F: LS strain; C, G: HLS strain; D, H: HLS2 strain

根据以上形态学观察结果, 参考《中国真菌志·第 43 卷》^[13], 初步鉴定菌株 IS 和 LS 均为环链棒束孢 [*Isaria cateniannulata* (Z.Q. Liang) Samson and Hywel-Jones], 菌株 HLS 和 HLS2 均为粉棒束孢 [*Isaria farinosa* (Holmsk.) Fries]。

2.2 两基因系统发育分析

通过形态学特征对 4 株虫生真菌进行了初步分类鉴定, 再进一步通过联合 rDNA ITS 和 β -Tubulin 序列构建系统发育树进行分子生物学鉴定。在 GenBank 下载相似性较高的 rDNA ITS 和 β -Tubulin 序列并构建 ML 系统发育树。图 3 结果显示, 菌株 IS 和 LS 与其他的环链棒束孢 (*Isaria cateniannulata*) 或环链拟青霉 (*Paecilomyces cateniannulatus*) 聚集在一个进化支上, Bootstrap 值为 92%, 其中菌株 IS、*Isaria cateniannulata* isolate ILDS-03 和 2 株 *Paecilomyces cateniannulatus* 聚类在一个小分支上, Bootstrap 值为 92%, 而菌株 LS 和 *Isaria cateniannulata* isolate IYYC-02 聚类在另一小分支上, Bootstrap 值为 98%; 菌株 HLS 和 HLS2 与粉棒束孢 (*Isaria farinosa*) 或粉拟青霉 (*Paecilomyces farinosus*) 聚集在一个进化支上, Bootstrap 值达到了 100%, 这表明它们在亲缘关系上非常接近。另外有研究已经证明, 环链拟青霉为环链棒束孢的同种异名, 粉拟青霉为粉棒束孢的同种异名^[13,22]。因此, 综合以上形态学特征和分子生物学鉴定结果, 确定菌株 IS 和 LS 均为环链棒束孢 [*Isaria cateniannulata* (Z.Q. Liang) Samson and Hywel-Jones], 菌株 HLS 和 HLS2 均为粉棒束孢 [*Isaria farinosa* (Holmsk.) Fries]。

2.3 8 种醇提取物对宫颈癌细胞 HeLa 增殖的抑制作用比较

MTT 实验结果显示, 用 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mg/mL 的菌丝醇提取物和发酵液醇提取物处理 HeLa 细胞 24 h 后, 它们均表现出对 HeLa 细胞增殖有一定的抑制作用, 但各醇提取物之间存在显著差异性。

如图 4 所示, 4 种菌丝醇提取物 (M-1、M-2、M-3、M-4) 对 HeLa 细胞增殖均有抑制作用。药物作用 24 h 后, 在一定处理浓度范围内, 各菌丝醇提取物均可抑制 HeLa 细胞增殖生长, 而且呈一定的浓度依赖性。当处理浓度达到 1.0 mg/mL 时, M-1、M-2、M-3、M-4 对 HeLa 细胞的抑制率分别为 30.39%、28.12%、35.29%、27.91%。

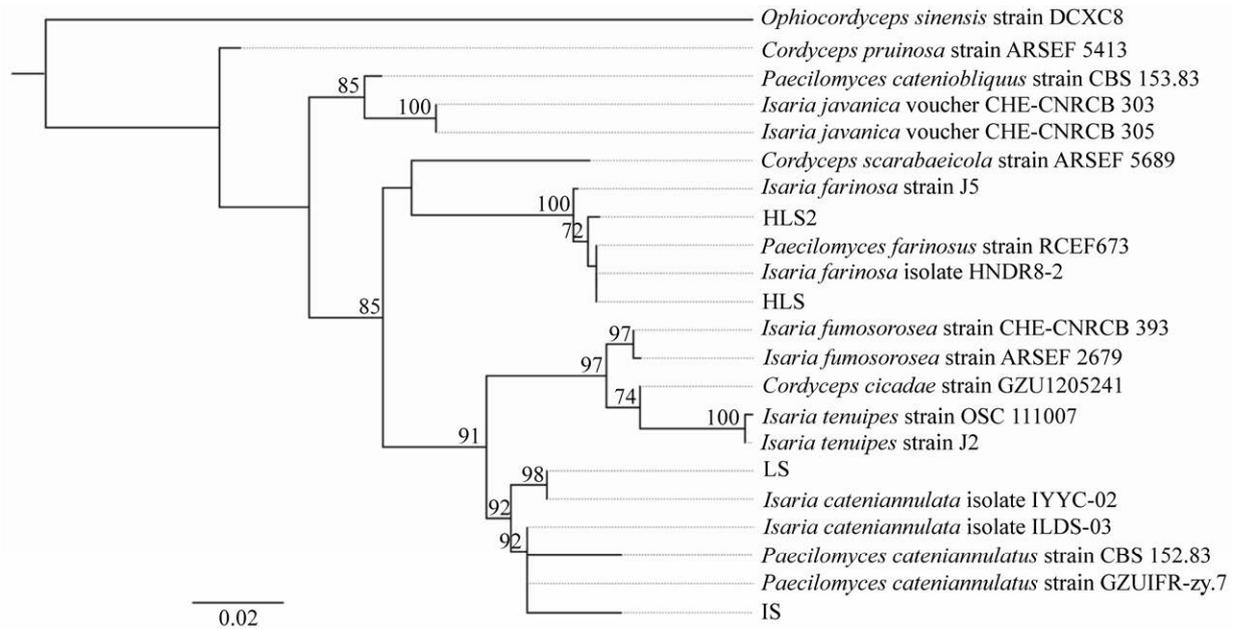


图3 基于 rDNA ITS 和 β -Tubulin 序列构建的 Maximum Likelihood 系统发育树

Figure 3 The maximum likelihood phylogenetic tree based on rDNA ITS and β -tubulin sequences

注: 分支点上的数值表示 Bootstrap 值; 标尺 0.02 表示序列差异的分支长度

Note: Numbers at the nodes are the bootstrap value; Bar 0.02 represents sequence divergence

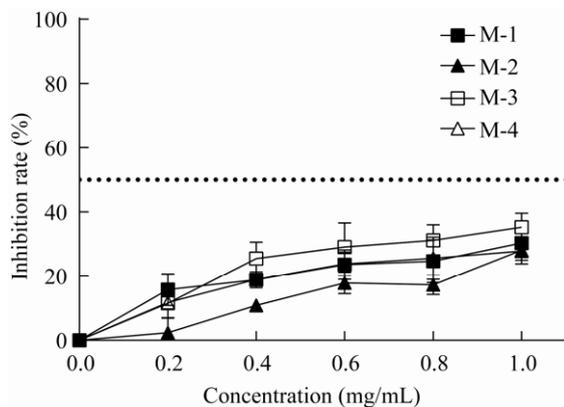


图4 虫生真菌菌丝醇提取物(M)对 HeLa 细胞增殖的抑制作用比较

Figure 4 Comparison of cell proliferation inhibitory effect of M on HeLa cells

如图 5 所示, 4 种发酵液醇提取物(F-1、F-2、F-3、F-4)对 HeLa 细胞增殖均有抑制作用。在一定处理浓度范围内, 随着各发酵液醇提取物浓度的增加, 细胞抑制率逐渐增大, 抑制作用增强, 呈现一定的浓度依赖性。特别是 F-3, 当其处理浓度为 0.8 mg/mL 时, 细胞抑制率超过 50%; 当其处理浓度为

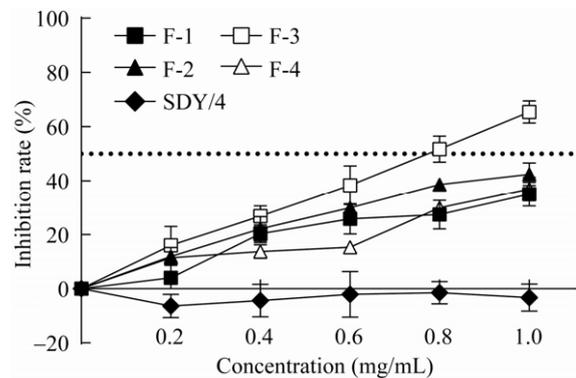


图5 虫生真菌发酵液醇提取物(F)和 SDY/4 培养液醇提取物对 HeLa 细胞增殖的抑制作用比较

Figure 5 Comparison of cell proliferation inhibitory effect of F and SDY/4 on HeLa cells

1.0 mg/mL, 细胞抑制率达到了 65.48%。与对照组相比, 用 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mg/mL 的 SDY/4 培养液醇提取物处理 HeLa 细胞 24 h 后, 均表现出对 HeLa 细胞增殖无明显的抑制作用, 因此, SDY/4 培养液醇提取物对 HeLa 细胞增殖的影响可以忽略不计, 可以排除培养基的本底差异。

如图6所示,在一定浓度范围内(0–1.0 mg/mL),用4株菌的菌丝醇提取物(M-1、M-2、M-3、M-4)和发酵液醇提取物(F-1、F-2、F-3、F-4)处理 HeLa 细胞 24 h 后, IC_{50} 值大小顺序表现为: M-1>M-4>M-2>M-3>F-1>F-4>F-2>F-3。半抑制浓度(IC_{50} 值)是用来衡量药物活性的指标,其数值越低,表明药物活性越强。由此可知,从整体上看,菌丝醇提取物抑制作用大小依次为粉棒束孢 HLS>环链棒束孢 LS>粉棒束孢 HLS2>环链棒束孢 IS,发酵液醇提取物抑制作用大小顺序同样为粉棒束孢 HLS>环链棒束孢 LS>粉棒束孢 HLS2>环链棒束孢 IS,可见粉棒束孢 HLS 的菌丝醇提取物 M-3 和发酵液醇提取物 F-3 都是同类别里活性最强的($P<0.001$);从相同菌种上看,同为粉棒束孢的 HLS 和 HLS2,在菌丝和发酵液醇提取物抑制作用大小上存在显著差异,表现为 HLS 明显强于 HLS2 ($P<0.001$),同为环链棒束孢的 IS 和 LS 的抑制活性也存在显著差异,表现为 LS 明显强于 IS ($P<0.05$, $P<0.001$);从个体上看,在一定处理浓度范围内,粉棒束孢 HLS 的发酵液醇提取物 F-3 对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用显著强于其他 7 种醇提取物($P<0.001$),其作用 24 h 的 IC_{50} 值为 0.667 8 mg/mL,而其他 7 种

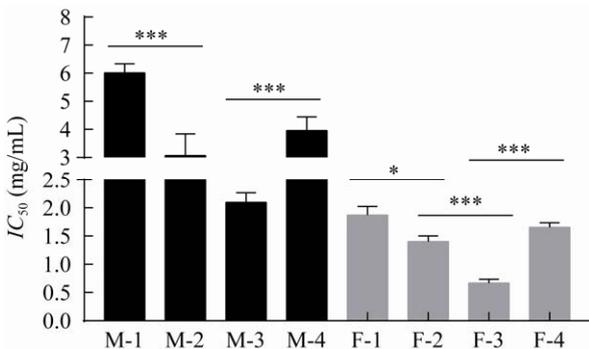


图6 虫生真菌菌丝醇提取物(M)和发酵液醇提取物(F)对 HeLa 细胞增殖影响的 IC_{50} 值

Figure 6 IC_{50} value of M and F on cell proliferation of HeLa cells

注:醇提取物的 IC_{50} 值差异显著性分析。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Note: Significant difference analysis of IC_{50} value of ethanol extracts. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

醇提取物 IC_{50} 值均大于 1 mg/mL,这暗示其具有深入研究的价值。因此,选取发酵液醇提取物 F-3 进行后续试验。

2.4 发酵液醇提取物 F-3 对宫颈癌细胞 HeLa 和正常细胞 BHK-21 增殖的影响

利用 MTT 法进一步检测 F-3 对 HeLa 细胞和 BHK-21 细胞生长的影响,同时设置市售的抗癌药物 5-氟尿嘧啶(5-Fu)作为阳性对照。结果表明,在一定处理浓度范围内,药物作用 48 h 后, F-3 和 5-Fu 均能显著抑制 HeLa 细胞增殖且呈一定的浓度依赖性, F-3 的 IC_{50} 值为 0.375 mg/mL, 5-Fu 的 IC_{50} 值为 0.121 7 mg/mL, F-3 的抑制活性稍弱于 5-Fu ($P<0.05$);就正常细胞 BHK-21 而言, F-3 对其只有轻微的抑制作用,而 5-Fu 具有较强的细胞毒性作用($P<0.001$) (图 7A、7B)。

2.5 发酵液醇提取物 F-3 对 HeLa 细胞和 BHK-21 细胞生长的影响

在倒置显微镜下观察 HeLa 细胞和 BHK-21 细胞经不同浓度 F-3 处理后的形态变化情况见图 8。HeLa 细胞被不同浓度的 F-3 处理 24 h 后,细胞形态发生明显的变化,与对照组相比,处理组的细胞生长缓慢,形态不规则,而且逐渐停止细胞分裂;随着处理浓度的增加,细胞开始变圆、脱落、漂浮,贴壁细胞数量明显减少(图 8A–8C);在 1.0 mg/mL 处理浓度下,细胞表面出现了大量的泡状突起,形态学上呈细胞凋亡状态(图 8D)^[23]。然而 BHK-21 细胞在 F-3 处理后,形态没有明显的变化,细胞表现出细长型、健康的生长状态(图 8E–8H)。

2.6 发酵液醇提取物 F-3 对 HeLa 细胞凋亡的影响

利用流式细胞仪检测 F-3 诱导 HeLa 细胞凋亡的发生情况,图 9 中 Q1 代表坏死细胞, Q2 代表晚期凋亡细胞, Q3 代表正常活细胞, Q4 代表早期凋亡细胞。对细胞总凋亡率统计结果表明, 0.2、0.6 和 1.0 mg/mL 的 F-3 处理 HeLa 细胞 24 h 后均可

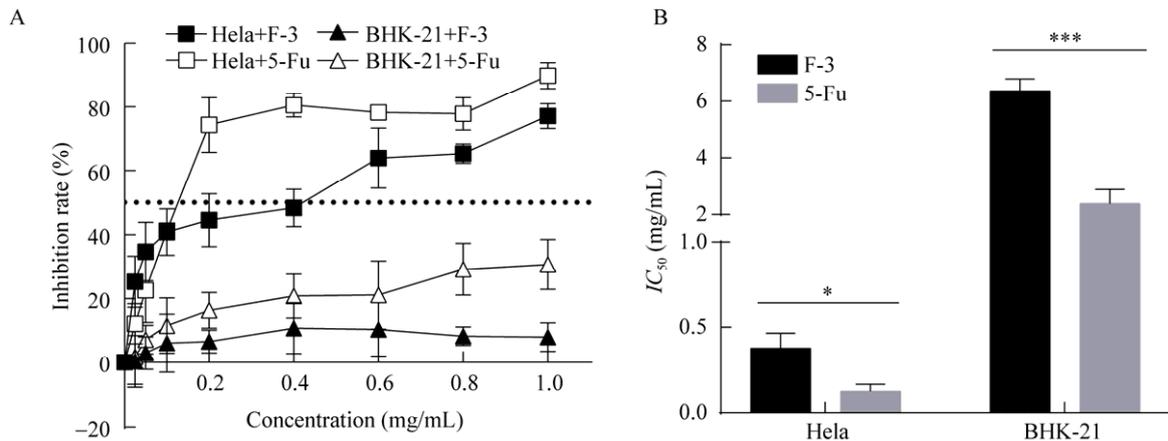


图7 发酵液醇提物 F-3 和 5-Fu 对 HeLa 细胞和 BHK-21 细胞增殖的影响

Figure 7 Effect of F-3 and 5-Fu on cell proliferation of HeLa and BHK-21 cells

注: A: 抑制率曲线; B: IC_{50} 值。与对照组比较: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$

Note: A: Inhibition rate curve graph; B: IC_{50} value. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ vs control group

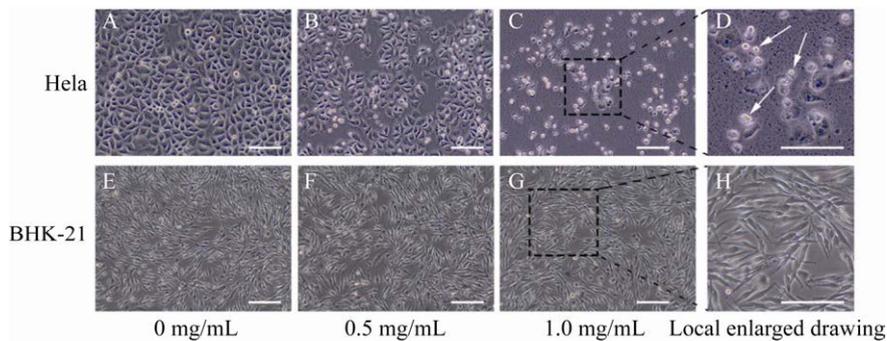


图8 倒置显微镜下观察 HeLa 和 BHK-21 细胞的形态变化(标尺=100 μ m)

Figure 8 Morphologic changes of HeLa and BHK-21 cells observed under an inverted fluorescence microscope (bars=100 μ m)

诱导细胞发生凋亡。与对照组相比,各处理浓度下的细胞总凋亡率均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.001$),而且具有一定的浓度依赖性;当处理浓度为 1.0 mg/mL 时,细胞总凋亡率可达到 32.45% (图 9A-9E)。

3 讨论与结论

相关研究表明,由于虫生真菌和昆虫的协同进化作用,昆虫病原真菌是最有可能发现新型药物先导化合物的类群之一,这为从天然真菌资源中寻找新型抗癌药物提供了方向和思路^[24]。本研究以野外采集的 4 株虫生真菌为材料,开展了相应的种类鉴定工作,并初步分析比较了 4 株菌抑制

癌细胞的活性差异。本研究基于形态学及 rDNA ITS 和 β -Tubulin 序列对 4 株虫生真菌进行鉴定,发现菌株 IS 和 LS 均为环链棒束孢,菌株 HLS 和 HLS2 均为粉棒束孢。环链棒束孢是一种具有很强生防潜力的虫生真菌,早在 20 世纪 80 年代初,在茶卷叶蛾蛹茧和一种鞘翅目昆虫上就已分离出该菌,有关报道证实其可感染菜青虫(*Pieris rapae*)、茶毛虫(*Euproctis pseudoconspersa*)、小菜蛾(*Plutella xylostella*)、柳杉雷癭蚊(*Resseliella odai*)等农林业害虫^[25-27]。粉棒束孢也被广泛应用于农林业害虫的生物防治,对杨尺蠖(*Apocheima cinerarius*)、桃小

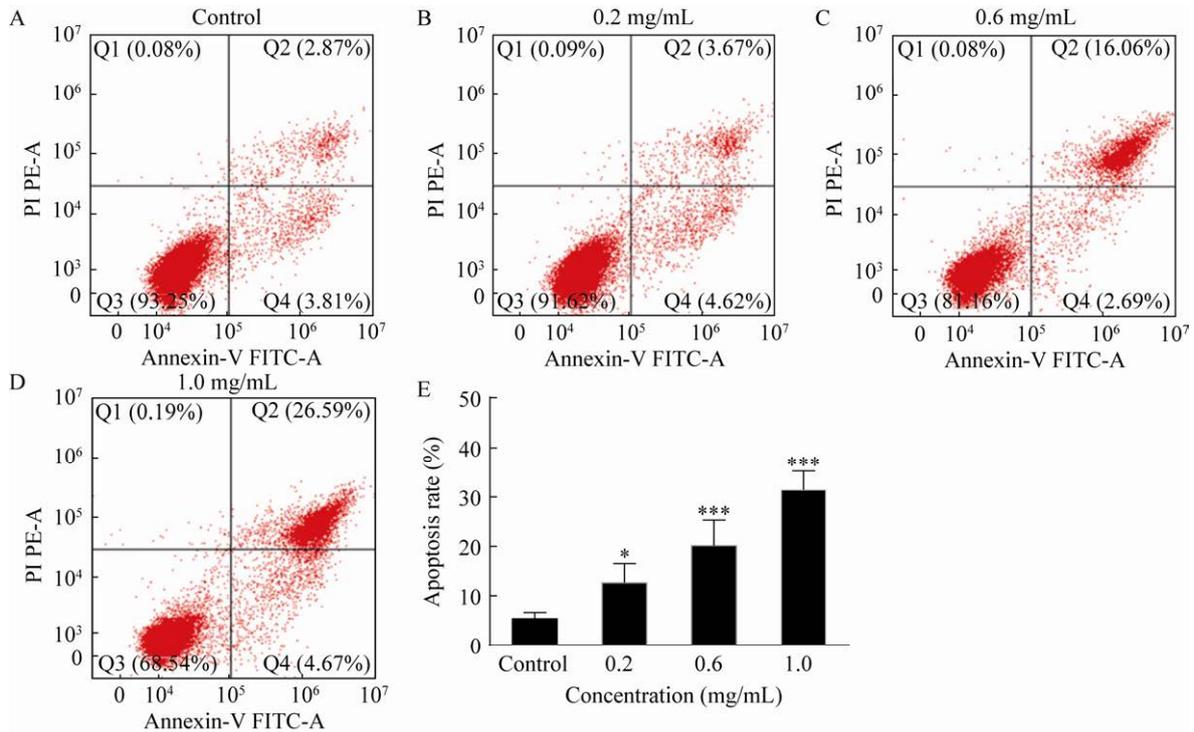


图9 流式细胞仪检测 HeLa 细胞凋亡率

Figure 9 HeLa cell apoptosis rate analyzed by flow cytometry

注: A: 对照组; B: 0.2 mg/mL; C: 0.6 mg/mL; D: 1.0 mg/mL; E: 各组细胞凋亡率。与对照组比较: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Note: A: Control; B: 0.2 mg/mL; C: 0.6 mg/mL; D: 1.0 mg/mL; E: Apoptosis rate in each experimental group. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$ vs control group

食心虫(*Carposina sasakii*)、桔粉蚧(*Planococcus citri*)等不同虫态的昆虫均具有较强的致病性^[28-30]。

国内外对环链棒束孢和粉棒束孢的研究主要集中在抗虫活性方面,而对其抗肿瘤活性研究较少。因此,本研究采用MTT法检测了这4株虫生真菌的醇提取物抑制HeLa细胞活性,结果显示,从整体上看,4株菌的菌丝醇提取物(M)和发酵液醇提取物(F)对HeLa细胞增殖均有一定的抑制作用,菌丝醇提取物对HeLa细胞的增殖抑制活性表现为:粉棒束孢HLS>环链棒束孢LS>粉棒束孢HLS2>环链棒束孢IS,发酵液醇提取物抑制活性同样表现为:粉棒束孢HLS>环链棒束孢LS>粉棒束孢HLS2>环链棒束孢IS,由此可见,粉棒束孢HLS的菌丝醇提取物M-3和发酵液醇提取物F-3都是同类别里活性最强的($P<0.001$);从相同菌种上看,同为粉棒束孢

的HLS和HLS2对HeLa细胞的抑制作用存在显著差异($P<0.001$),同为环链棒束孢的IS和LS对HeLa细胞的抑制作用也存在显著差异($P<0.05$, $P<0.001$);从个体上看,粉棒束孢HLS的发酵液醇提取物F-3对HeLa细胞的抑制作用最强,其作用24h的 IC_{50} 值为0.6678 mg/mL,明显低于其他7种醇提取物($P<0.001$)。以上结果表明4株虫生真菌抑制HeLa癌细胞的活性存在显著差异,由于4株实验菌株是从4个不同地理位置采集,且在4种不同寄主昆虫中分离纯化获得,因此,推测4株虫生真菌抑制癌细胞的活性存在显著差异可能与这4株菌的地理来源、寄主等因素有关,至于是何种因素发挥主要作用还有待深入研究。

粉棒束孢异名为粉拟青霉,又称虫草棒束孢、虫花棒束孢,其本身具有广泛的药理活性,如降血

脂、止咳祛痰、抗肿瘤、护肝利胆等,对人体具有保健作用,该菌在生物医药领域内具有很大的应用潜力^[31-33]。MTT 实验选取抑制作用最强的粉棒束孢 HLS 的发酵液醇提物 F-3,进一步探究其对 HeLa 细胞增殖和生长的影响,同时设置正常细胞 BHK-21 作为阴性对照,设置抗癌药物 5-Fu 作为阳性对照,结果表明 F-3 可显著抑制 HeLa 细胞的增殖,而且对正常细胞 BHK-21 只具有轻微的细胞毒性。为了更直观地反映 F-3 对 HeLa 细胞和 BHK-21 细胞的毒性作用,还进行了显微镜观察细胞形态变化,BHK-21 细胞形态没有发生明显的变化,呈现健康的生长状态,而 HeLa 细胞的增殖和生长受到明显的抑制,形态学上呈现细胞凋亡状态。进一步利用流式细胞仪检测细胞凋亡,结果显示 F-3 可诱导 HeLa 细胞凋亡,而且细胞总凋亡率随着处理浓度的增加而逐渐增大。众所周知,如果天然产物对正常细胞具有较强的细胞毒性,就不能作为抗肿瘤药物的开发资源^[34-35]。因此,发酵液醇提物 F-3 可以进一步用于对 HeLa 细胞的抗肿瘤活性研究。

本研究比较了从野外采集的 4 株虫生真菌对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的抑制活性差异,并进一步分析了来源于一株粉棒束孢的发酵液醇提物 F-3 对 HeLa 细胞的抑制活性。4 株虫生真菌对 HeLa 细胞增殖均有明显的抑制作用,但 4 株菌的抑制作用存在显著差异,来源于粉棒束孢的 F-3 醇提物对正常细胞 BHK-21 增殖和生长无显著抑制作用,但对 HeLa 癌细胞的增殖和生长抑制活性最强,而且具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用,这表明粉棒束孢 HLS 株系具有进一步研究利用的价值。本研究为深入研究粉棒束孢的抗癌活性机理奠定了基础,也为天然虫生真菌资源的开发利用提供了一定的科学依据。

REFERENCES

- [1] Wen TC, Zha LS, Kang JC, Hyde KD. Some entomological issues in studying entomogenous fungi[J]. *Mycosystema*, 2016, 35(11): 1303-1309 (in Chinese)
- [2] Liang ZQ. *Flora Fungorum Sinicorum*. Vol. 32. *Cordyceps*[M]. Beijing: Science Press, 2007: 1-190 (in Chinese)
梁宗琦. 中国真菌志. 第三十二卷. 虫草属[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 1-190
- [3] Dong CH, Li WJ, Li ZZ, Yan WJ, Li TH, Liu XZ, Cai L, Zeng WB, Chai MQ, Chen SJ, et al. *Cordyceps* industry in China: current status, challenges and perspectives—Jinhu declaration for *cordyceps* industry development[J]. *Mycosystema*, 2016, 35(1): 1-15 (in Chinese)
董彩虹, 李文佳, 李增智, 闫文娟, 李泰辉, 刘杏忠, 蔡磊, 曾文波, 柴美清, 陈仕江, 等. 我国虫草产业发展现状、问题及展望——虫草产业发展金湖宣言[J]. *菌物学报*, 2016, 35(1): 1-15
- [4] Zhang YJ, Li EW, Wang CS, Li YL, Liu XZ. *Ophiocordyceps sinensis*, the flagship fungus of China: terminology, life strategy and ecology[J]. *Mycology*, 2012, 3(1): 2-10
- [5] Li CR, Zuo DP, Nan SJ, Pu SC, Fan MZ, Li ZZ. *Cordyceps takaomontana* and its anamorph *Paecilomyces tenuipes*[J]. *Mycosystema*, 2007, 26(2): 217-220 (in Chinese)
李春如, 左登平, 南圣姬, 蒲顺昌, 樊美珍, 李增智. 高雄山虫草及其细脚拟青霉无性型[J]. *菌物学报*, 2007, 26(2): 217-220
- [6] Xie F, Li W, Chen MZ, Yu J. Antitumor activity and mechanism of action of wild *Cordyceps sobolifera* polysaccharide[J]. *Food Science*, 2016, 37(13): 209-213 (in Chinese)
谢飞, 李伟, 陈美珍, 余杰. 野生蝉花多糖抗肿瘤活性及其作用机制[J]. *食品科学*, 2016, 37(13): 209-213
- [7] Chen AH, Shao Y, Li JW, Jiang ZZ, Chen HW. Antitumor activity of cultured fruiting bodies of *Cordyceps cicadae*[J]. *Food Science*, 2015, 36(9): 194-197 (in Chinese)
陈安徽, 邵颖, 李继武, 蒋昭志, 陈宏伟. 人工培育蝉花虫草的抗肿瘤活性[J]. *食品科学*, 2015, 36(9): 194-197
- [8] Xi RJ, Wang WJ, Chen JL, Yao YJ. Antileukemia properties of different aqueous extracts from *Cordyceps militaris* in vitro[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22(7): 793-804
- [9] Park JG, Son YJ, Lee TH, Baek NJ, Yoon DH, Kim TW, Aravinthan A, Hong S, Kim JH, Sung GH. Anticancer efficacy of *Cordyceps militaris* ethanol extract in a xenografted leukemia model[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 2017: 1-7
- [10] Liu P. Evaluation of clinical epidemiological data of cervical cancer in mainland China for 13 years[J]. *Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics*, 2018, 34(1): 41-45 (in Chinese)

- 刘萍. 中国大陆 13 年宫颈癌临床流行病学大数据评价[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34(1): 41-45
- [11] Cai HB, Chen HZ. Cervical Cancer[M]. Beijing: Science and Technology Literature Press, 2010: 321-336 (in Chinese)
蔡红兵, 陈惠祯. 子宫颈癌[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2010: 321-336
- [12] Zaman M, Huang LD, Ye X, Abuduaini A, Zhou HY, Ma YF, Suo FY. Antioxidant and anti-lung cancer activity of ethanol extract from *Ophiocordyceps gracilis* in Xinjiang[J]. Journal of Central China Normal University (Natural Sciences), 2019, 53(4): 542-550 (in Chinese)
曼孜拉木·扎曼, 黄罗冬, 叶星, 艾菲热·阿布都艾尼, 周慧英, 马玉凤, 索菲娅. 新疆产细虫草菌醇提取物抗氧化及抗肺癌活性研究[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2019, 53(4): 542-550
- [13] Liang ZQ, Han YF, Chu HL. Flora Fungorum Sinicorum. Vol. 43. *Paecilomyces, Isaria, Taifanlangia*[M]. Beijing: Science Press, 2013: 1-158 (in Chinese)
梁宗琦, 韩燕峰, 初华丽. 中国真菌志. 第四十三卷. 拟青霉属、棒束孢属、戴氏霉属[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 1-158
- [14] Masoudi A, Koprowski JL, Bhattarai UR, Wang D. Elevational distribution and morphological attributes of the entomopathogenic fungi from forests of the Qinling Mountains in China[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(3): 1483-1499
- [15] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[A]/Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR Protocols[M]. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322
- [16] O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1997, 7(1): 103-116
- [17] Pei XY. Study on anticancer activity and omics of four strains *Cordyceps*[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2019 (in Chinese)
裴晓亚. 四株虫草菌抗癌活性及组学比较研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2019
- [18] Du S, Luo AQ, Liu MF. Definition and calculation of alcohol concentration in alcohol precipitation process of Chinese materia medica extracts[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2012, 43(8): 1652-1655 (in Chinese)
杜松, 罗爱勤, 刘美凤. 中药浸膏醇沉工艺中醇浓度概念与计算方法辨析[J]. 中草药, 2012, 43(8): 1652-1655
- [19] Wu JY, Sheikho A, Ma H, Li TC, Zhao YQ, Zhang YL, Wang D. Molecular mechanisms of *Bombyx batryticatus* ethanol extract inducing gastric cancer SGC-7901 cells apoptosis[J]. Cytotechnology, 2017, 69(6): 875-883
- [20] Liu JB, Liu K, Liu CY, Qi M, Du YR, Hu KH, Fu JS. Identification of seven wild cordycipitoid fungal strains and inhibiting activities of their mycelium ethanol extract against HepG2 cells[J]. Mycosystema, 2018, 37(8): 1044-1053 (in Chinese)
刘建兵, 刘昆, 刘城移, 戚梦, 杜苑如, 胡开辉, 傅俊生. 7 株野生虫草菌的鉴定及其菌丝体醇提取物对 HepG2 细胞的抑制活性[J]. 菌物学报, 2018, 37(8): 1044-1053
- [21] Liu X, Hou RL, Liu JB, Hu KH, Lin WX, Zheng MF, Fu JS. Screening of anti-breast cancer fractions from *Beauveria bassiana* submerged ferment liquid and analysis of the active ingredients[J]. Mycosystema, 2017, 36(12): 1659-1666 (in Chinese)
刘鑫, 侯若琳, 刘建兵, 胡开辉, 林文雄, 郑明锋, 傅俊生. 球孢白僵菌深层发酵液抗乳腺癌活性部位筛选及成分分析[J]. 菌物学报, 2017, 36(12): 1659-1666
- [22] Kepler RM, Luangsa-ard JJ, Hywel-Jones NL, Quandt CA, Sung GH, Rehner SA, Aime MC, Henkel TW, Sanjuan T, Zare R, et al. A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (*Hypocreales*)[J]. IMA Fungus, 2017, 8(2): 335-353
- [23] Zhao BT, Zhang J, Guo X, Wang JL. Microwave-assisted extraction, chemical characterization of polysaccharides from *Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb and its antioxidant activities evaluation[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 31(2): 346-356
- [24] He YQ, Hu FL, Li CR, Zuo DP, Liu YJ, Fan MZ. Antitumor activities of extracts from mycelium of 40 entomogenous fungi[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2008, 35(1): 84-88 (in Chinese)
何亚琼, 胡丰林, 李春如, 左登平, 刘玉军, 樊美珍. 40 株虫生真菌菌丝体提取物抗肿瘤活性的初步研究[J]. 安徽农业大学学报, 2008, 35(1): 84-88
- [25] Liang ZQ. Two new species of *Paecilomyces* from insects[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1981, 21(1): 31-34 (in Chinese)
梁宗琦. 拟青霉属的两个新种[J]. 微生物学报, 1981, 21(1): 31-34
- [26] He J, Kang JC, Lei BX, Liu XY, Wen TC. Identification of four entomogenous fungi and preliminary evaluation on their insecticidal activities to *Plutella xylostella* L.[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2010, 37(4): 341-346 (in Chinese)
何劲, 康冀川, 雷帮星, 刘心怡, 文庭池. 四株虫生真菌的鉴定及其对小菜蛾的室内毒力[J]. 植物保护学报, 2010, 37(4): 341-346
- [27] Shimazu M. *Paecilomyces cateniannulatus* Liang, a commonly found, but an unrecorded entomogenous fungus in Japan[J]. Applied Entomology and Zoology, 2001, 36(3): 283-288
- [28] Wang N, Yao HQ, Xie YP, Liu WM, Zhang YJ. Isolation and identification of an entomopathogenic fungus isolated

- from the pupae of *Apocheima cinerarius*[J]. Microbiology China, 2016, 43(11): 2428-2436 (in Chinese)
- 王妮, 姚红青, 谢映平, 刘卫敏, 张永杰. 一株感染杨尺蠖蛹的病原真菌的分离及鉴定[J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2428-2436
- [29] Li J, Zhu YM, Xue JL, Xiong Q, Zhao F, Xie YP. Virulence of the five strains of entomopathogenic fungi infected on the larvae of *Carposina sasakii*[J]. Acta Phytopylacica Sinica, 2012, 39(6): 549-555 (in Chinese)
- 李捷, 朱永敏, 薛皎亮, 熊琦, 赵飞, 谢映平. 五株病原真菌对桃小食心虫的致病力[J]. 植物保护学报, 2012, 39(6): 549-555
- [30] Demirci F, Muştu M, Kaydan MB, Ülgentürk S. Laboratory evaluation of the effectiveness of the entomopathogen; *Isaria farinosa*, on citrus mealybug, *Planococcus citri*[J]. Journal of Pest Science, 2011, 84(3): 337-342
- [31] Hu FL, Li ZZ. Secondary metabolites and their bioactivities of *Cordyceps* and its related fungi[J]. Mycosystema, 2007, 26(4): 607-632 (in Chinese)
- 胡丰林, 李增智. 虫草及相关真菌的次生代谢产物及其活性[J]. 菌物学报, 2007, 26(4): 607-632
- [32] Jiang YH, Jiang XL, Wang P, Mou HJ, Hu XK, Liu SQ. The antitumor and antioxidative activities of polysaccharides isolated from *Isaria farinosa* B05[J]. Microbiological Research, 2008, 163(4): 424-430
- [33] Zhang YG, Liu SC, Liu HW, Liu XZ, Che YS. Cycloaspeptides F and G, cyclic pentapeptides from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Isaria farinosa*[J]. Journal of Natural Products, 2009, 72(7): 1364-1367
- [34] Wang WH, Fan H, Zhang JS, Yang Y, Zhao XL, Zhang K, Wu D, Yan MQ, Jia W. Inhibition of MCF7 breast cancer cell proliferation and cell cycle disruption by ethanolic extracts of *Phellinus baumii* fruit bodies[J]. Acta Edulis Fungi, 2015, 22(2): 46-50 (in Chinese)
- 汪雯翰, 樊华, 张劲松, 杨焱, 赵香丽, 张凯, 吴迪, 颜梦秋, 贾薇. 桑黄醇提物对 MCF7 乳腺癌细胞活力和周期改变的影响[J]. 食用菌学报, 2015, 22(2): 46-50
- [35] Wang WH, Yang Y, Zhu LN, Jia W, Zhang JS, Liu YF, Yan MQ, Zhao XL, Zhang K, Zhang HN, et al. Inhibitory effects of ethanol extract of *Sanghuangporus sanghuang* fruiting bodies on SW620 colon cancer cells[J]. Mycosystema, 2018, 37(12): 1751-1760 (in Chinese)
- 汪雯翰, 杨焱, 朱丽娜, 贾薇, 张劲松, 刘艳芳, 颜梦秋, 赵香丽, 张凯, 张赫男, 等. 桑黄子实体醇提物对 SW620 结肠癌细胞的抑制作用[J]. 菌物学报, 2018, 37(12): 1751-1760