

四种植物内生真菌的分离及其抗肿瘤活性的筛选

缪莉* 王元元 朱磊 吴正军 周如梅
(阜阳师范学院生命科学学院 安徽 阜阳 236041)

摘要: 从银杏、合欢、臭椿和苦楝的树皮中分离到 61 株内生真菌。MTT法检测显示在 45.9%的菌株发酵液粗提物在 200 $\mu\text{g/mL}$ 时对人食道癌细胞EC109 的生长抑制率大于 50%。其中 6 株内生真菌(YX5, YX17, YX36, KL1, CC1, CC5)在 50 $\mu\text{g/mL}$ 时仍具有较高的细胞毒活性, 且活性成分主要分布在菌株的发酵液中。合欢内生真菌中的活性菌株比例最小, 在 50 $\mu\text{g/mL}$ 时均未显示任何对 EC109 细胞的抑制作用。银杏中的高活性菌株比例最大, 占银杏内生真菌的 15.8%。银杏分离菌株 YX5 的活性最为突出, 其发酵液粗提物对 3 种肿瘤细胞EC109, HONE1 和 HeLa 的抑制率 IC_{50} 分别是 18.3 $\mu\text{g/mL}$ 、3.6 $\mu\text{g/mL}$ 和 6.5 $\mu\text{g/mL}$ 。研究结果表明, 作为抗肿瘤药物的潜在来源银杏内生真菌值得关注。

关键词: 植物内生真菌, 抗肿瘤活性, 筛选, 银杏

Endophytic Fungi from Four Plant Species: Their Isolation and Antitumor Activity

MIAO Li* WANG Yuan-Yuan ZHU Lei WU Zheng-Jun ZHOU Ru-Mei

(School of Life Science, Fuyang Teachers College, Fuyang, Anhui 236041, China)

Abstract: We isolated 61 endophyte isolates from the bark of 4 plants, *Ginkgo biloba* L., *Albizia julibrissin* Durazz., *Ailanthus altissima* (Mill) Swingle and *Melia azedarach* L. At the test concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$, higher than 50% of antitumor activities were demonstrated with crude extracts from 45.9% of fungal culture in MTT assay. Six isolates, YX5, YX17, YX36, KL1, CC1 and CC5, still showed higher cytotoxicity at 50 $\mu\text{g/mL}$. No isolates from *A. julibrissin* had inhibitory effect towards EC109 at the test concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$; while about 15.8% of isolates from *G. biloba* were active. IC_{50} of the extract from the most active isolate YX5 against EC109, HONE1 and HeLa were 18.3 $\mu\text{g/mL}$, 3.6 $\mu\text{g/mL}$ and 6.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Our results indicate that endophytes from *G. biloba* could be regarded as a potent source of antitumor drugs.

Keywords: Endophytic fungi, Antitumor activity, Screening, *Ginkgo biloba*

植物内生真菌(Endophytic fungi)能产生许多具有各种生物活性的物质。自从 1993 年Stierie等^[1]报道从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)的韧皮部分离到的内生真菌*Taxomyces andreanae*可产生与宿主相同的

抗肿瘤代谢产物紫杉醇以来, 国内外的研究者已经从植物内生真菌中已分离到许多具有抗肿瘤活性的天然产物^[2,3], 由于真菌来源广泛, 可以通过发酵生产或通过改进和控制发酵工艺及菌种选育等途径提

高所需化合物的含量,且不存在大量破坏生物资源等问题。因此,从真菌中研究开发高效低毒且资源充分的抗肿瘤药物具有良好的前景^[4]。

银杏(*Ginkgo biloba* L)、合欢(*Albizia julibrissin* Durazz)、臭椿(*Ailanthus siliquosa* Swingle)、苦楝(*Melia azedarach* L)均有一定的药用价值。银杏富含黄酮类物质,具有防治心脑血管疾病、抗肿瘤、抗病毒、消炎、抗血小板活化因子、延缓衰老和美容等治疗和保健作用^[5,6]。合欢皮具解郁安神、活血消肿之效。臭椿的树皮,具有清热、消炎、燥湿、止血、杀虫等功效^[7]。臭椿根皮提取物具有抗阿米巴原虫活性,也可作为除虫剂;并有明显的抗肿瘤作用,可用于治疗宫颈癌、结肠癌、直肠癌等^[8]。苦楝皮中含有苦楝素,具有较强的杀虫作用,可治多种肠道寄生虫,为广谱驱虫中药^[9]。在这4种植物中,合欢、臭椿内生真菌的研究尚未见报道,而对银杏、苦楝内生真菌仅有少量的研究报道^[10]。其中关于银杏内生真菌的研究主要集中在分离鉴定及其抗菌活性。如郭建新等^[11]报道从银杏根、茎、叶和果实中分离到的约60%的内生真菌中对7种植物病原真菌具有抑菌活性。但对于银杏内生真菌抗肿瘤活性的研究却很少。

鉴于这4种植物均具有良好的杀虫消炎抗肿瘤功效,相信它们的内生真菌也具有产生与其宿主相同或相似的活性物质,因此本文对银杏、合欢、臭椿、苦楝树皮中的内生真菌进行分离,并对其抗肿瘤活性进行筛选,为进一步分离高效低毒的抗肿瘤活性物质提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

分离材料:银杏、臭椿、合欢、苦楝采自阜阳师范学院校园,取材部位为距地1.5 m左右的主干树皮,厚度约3 mm~8 mm,银杏树龄30~40年,树干直径50 cm~60 cm;臭椿树龄8~10年,树干直径10 cm~15 cm;合欢树龄15~20年,树干直径30 cm~40 cm;苦楝树龄10~15年,树干直径30 cm~40 cm。

肿瘤细胞:人食道癌EC109细胞系来自于中南民族大学发酵与酶工程研究室,人宫颈癌HeLa细胞系和人鼻咽癌HONE1细胞系来自于香港科技大学癌症研究中心。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离纯化与鉴定:采用组织块法^[12],对4种药用植物树皮中内生真菌进行分离。取采集的新鲜银杏、臭椿、合欢和苦楝树皮,用蒸馏水将新鲜植物表面洗净,稍干后去外表皮,取其韧皮部或木质部内切成适宜长度的小段,在75%乙醇中浸泡5 min,再用无菌水冲洗3~4次,无菌滤纸吸干。再将其切成5 mm×5 mm的小块贴放于含100 μg/mL青霉素和链霉素的PDA培养基上,每皿4块,每种树皮样品做10块平皿。置25℃恒温培养箱中培养3 d~20 d,待培养基上各植物组织周围长出菌丝后,采用尖端菌丝挑取法转移至新的PDA培养基平板上,并置于25℃恒温培养箱中继续培养。待挑取的菌丝长成直径3 cm左右的菌落后,根据各菌落颜色、形态判断是否为纯菌。若长出的菌落不是纯菌,可再次采用尖端菌丝挑取法转移至新的PDA培养基上进行纯化。纯化后的菌株于10%的无菌甘油管内-80℃保存。

鉴定:对具有高肿瘤活性的菌株,根据其菌落的平皿培养特征,并利用光学显微镜观察产孢结构和孢子形态等特征,参考Saccardo分类系统^[13]鉴定菌株的分类单元。

1.2.2 内生真菌的液体发酵培养及后处理:将菌丝块接种于装有50 mL PDB培养基的250 mL的三角瓶中,25℃、120 r/min摇床培养7 d。发酵液经6~8层纱布过滤后除菌丝体,滤液用等体积乙酸乙酯萃取2次,合并有机相,35℃真空浓缩后,将残余物溶于DMSO中,配成浓度为50 g/L的溶液,即为发酵液粗提物。过滤得到的菌丝体经冷冻干燥后,用适量甲醇萃取2次,合并甲醇相,真空浓缩后,残余物溶于DMSO中,即为菌体粗提物。

1.2.3 肿瘤细胞的培养与内生真菌抗肿瘤活性的测定:采用人食道癌EC109细胞系,人宫颈癌HeLa细胞系和人鼻咽癌HONE1细胞系,用含10%新生牛血清的RPMI1640完全培养基,在37℃通入5% CO₂的细胞培养箱中培养传代。采用体外细胞毒测定的MTT法测定菌体粗提物或发酵液粗提物的抗肿瘤活性。取对数生长期的肿瘤细胞。用胰蛋白酶消化后,用完全培养基制成细胞悬浮液,血球计数板计数,随后取80 μL接种于96孔板,按每孔5000~8000个细胞接种,留两孔做空白对照。置于5% CO₂, 37℃培养箱中培养1 d后,加入20 μL经完全培养液稀释

的样品(阴性对照组加 20 μL 培养液, 空白组加入 100 μL 的培养液, 每个样品做 3 个重复), 继续培养 2 d 后取出, 吸弃培养基, 每孔加入 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 MTT 溶液 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 h 后, 每孔再加 100 μL DMSO, 37 $^{\circ}\text{C}$ 溶解 30 min; 用酶标仪测量各孔吸光值(测量波长为 570 nm)。按下式计算抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{阴性对照 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{阴性对照 OD 值} - \text{空白对照 OD 值}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 内生真菌的分离

从 4 种药用植物银杏、合欢、臭椿和苦楝的树皮中共分离到内生真菌 61 株。其中银杏、苦楝、臭椿中分离到的内生真菌数量较多, 占总数的 30% 左右, 合欢中分离到的菌株数量则很少(表 1)。在分离过程中发现, 不同植物中内生真菌生长快慢不一。苦楝树皮中内生真菌生长最快, 接种后 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d 就已经有菌落长出; 随后, 臭椿树皮样品中的内生真菌开始生长, 且菌落生长速度较快; 银杏和合欢中内生真菌菌落出现最晚, 接种培养 6 d 以后自组织块边缘才开始有菌丝的生长, 且生长较为缓慢。从不同树种中分离到的许多真菌在菌落形态、颜色和菌丝生长速度等方面差异较为显著, 表明内生真菌具有一定的宿主特异性, 不同宿主环境对其中的内生真菌生长具有一定的影响。

表 1 4 种植物内生真菌的分离结果
Table 1 Summary of Endophytic fungi isolated from four plant species

宿主植物 Host	样本数 Number of samples	分离菌株数 Number of isolates
银杏 <i>Ginkgo biloba</i>	40	19
合欢 <i>Albizia julibrissin</i>	40	7
苦楝 <i>Melia azedarach</i>	40	18
臭椿 <i>Ailanthus altissima</i>	40	17
总计 Total	160	61

2.2 内生真菌的抗肿瘤活性

供测菌株的发酵液粗提物抗肿瘤活性测定结果显示, 分离到的 61 株内生真菌中, 72.1% 的菌株表现出不同的细胞毒活性, 在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的测试浓度下, 对食道癌细胞 EC109 的生长抑制率大于 50% 的活性

菌株比率为 45.9%, 在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的测试浓度下, 活性菌株的比率为 21.3%, 有 6 株真菌(YX5, YX17, YX36, KL1, CC1, CC5) 在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下对 EC109 仍有着 50% 以上的抑制率, 显示出较高的活性(表 2)。臭椿、苦楝和银杏内生真菌的活性菌株比例较高, 在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的测试浓度下, 约 50% 的菌株显示出一定程度的抗肿瘤活性, 合欢内生真菌的活性菌株比例较低, 为 28.6%。银杏内生真菌中的高活性菌株比例最高, 6 株高活性菌株中有 3 株分离自银杏。

2.3 高活性菌株的鉴定及抗瘤谱的测定

对 6 株高活性菌株进行了鉴定。并分别比较了这 6 株活性菌株的发酵液粗提物和菌体粗提物对 EC109, HeLa 和 HONE1 细胞的抗肿瘤活性。结果显示, 除 YX36 和 CC5 未见孢子外, 其它高活性菌株 YX5、YX17、KL1、CC1, 分别属于曲霉属(*Aspergillus*), 链格孢属(*Alternaria*), 茎点霉属(*Phoma*)和芽枝孢属(*Cladosporium*)。

6 株高活性菌株发酵液粗提物的抗肿瘤活性显著地高于相应的菌体粗提物。大多数的菌体粗提物在浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 3 种癌细胞的生长没有明显地抑制作用, 而在此浓度下, 80% 以上的发酵液粗提物对这 3 种肿瘤细胞表现出显著的抗肿瘤活性(图 1)。其中 YX5 的抗肿瘤效果最为显著。在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 EC109, HONE1 和 HeLa 细胞生长的抑制率均在 50% 以上, 其 IC_{50} 分别为 18.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 6.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 讨论

从植物中寻找抗肿瘤的天然活性物质是开发新型药物的重要研究内容。人们已从南方红豆杉、三尖杉等裸子植物中成功地开发出了紫杉醇、三尖杉碱、鬼臼毒素等抗肿瘤新药^[14-16]。但由于物种资源稀少、生长速度缓慢及生态保护等问题, 制约了天然药物的进一步开发和利用。药用植物内生真菌的研究和开发无疑是解决问题的途径之一。本文研究结果表明, 银杏、苦楝、臭椿和合欢中有着具有明显细胞毒抗肿瘤活性的菌株, 约占总分离菌株数的 72%。与某些相关的内生真菌抗肿瘤活性研究^[17]相比, 活性菌株比率高, 说明这些植物的内生真菌中能产生有抗肿瘤活性次级代谢产物的菌株数量较大, 均有利于药物开发的潜力。研究发现, 高活性菌

表 2 各个菌株的发酵液粗提取物对食道癌细胞 EC109 的抗肿瘤活性
Table 2 Antitumor activity of crude extracts of each endophytic fungal isolate against EC109

菌株 Strains	抑制率 Inhibitory effect(%)			菌株 Strains	抑制率 Inhibitory effect(%)		
	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL		200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL
HH1	91.2±3.52	91.7±7.16	27.4±4.55	KL3	42.9±3.67	18.7±3.17	14.1±3.46
HH2	18.7±3.12	8.2±0.54	0	KL6	21.8±6.23	7.1±3.32	0
HH4	54.7±5.21	39.1±3.69	22.5±6.22	KL7	53.7±5.66	27.9±4.52	11.9±5.52
HH6	30.5±2.25	28.0±1.98	0	KL8	36.2±3.57	16.9±4.67	0
YX2	36.6±6.12	32.2±7.14	0	KL9	69.6±7.29	62.3±7.22	20.2±2.93
YX5	80.2±2.41	71.2±8.52	60.5±5.36	KL11	84.7±5.55	80.7±4.45	36.2±6.33
YX6	89.6±3.18	73.9±5.26	0	KL12	80.9±6.02	6.1±2.08	0
YX7	69.1±1.56	28.8±5.37	0	KL16	67.2±7.33	54.5±6.39	47.8±7.21
YX8	47.2±2.58	0	0	KL17	90.5±9.31	75.5±3.78	43.8±6.28
YX13	70.2±9.43	39.9±4.37	42.9±5.31	KL23	54.5±2.47	0	9.4±3.25
YX14	28.5±5.22	0	0	CC1	99.6±0.12	96.6±2.21	53.2±5.94
YX15	63.5±3.81	50.0±5.06	49.1±7.23	CC2	78.5±5.03	38.2±2.85	0
YX17	80.5±7.05	78.6±6.37	53.8±5.30	CC4	39.7±4.91	6.7±2.26	0
YX18	45.1±4.36	33.9±6.32	34.3±4.81	CC5	97.7±2.10	90.1±0.47	62.5±6.51
YX19	43.7±7.55	16.2±2.45	0	CC6	46.1±4.39	5.05±3.69	0
YX22	38.9±2.39	26.0±3.68	0	CC7	91.6±5.05	83.9±5.69	41.8±3.45
YX23	21.5±0.96	17.1±4.16	0	CC8	65.8±3.02	17.7±3.05	0
YX25	50.3±5.37	35.1±5.42	10.7±2.08	CC10	79.6±7.03	41.0±6.62	11.4±2.18
YX34	31.4±7.11	0	0	CC11	52.2±5.39	28.2±2.37	0
YX36	72.7±3.64	70.5±7.21	67.8±5.02	CC13	31.9±0.59	8.0±4.08	0
KL1	96.3±3.25	92.9±2.63	54.8±4.52	CC14	96.3±2.26	51.5±7.01	0
KL2	76.4±0.78	87.1±3.21	0	CC24	88.7±5059	60.5±2.94	40.8±5.29

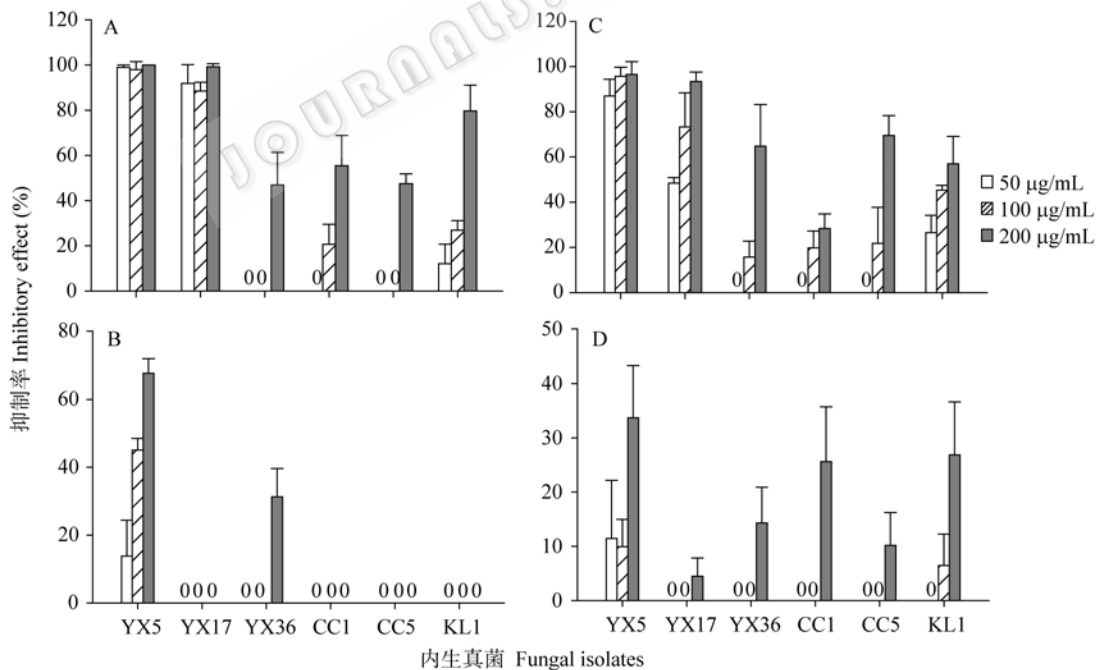


图 1 6 株活性菌株的发酵液粗提取物和菌体粗提取物对 HONE1 细胞和 HeLa 细胞的抗肿瘤活性
Fig. 1 Antitumor activity of crude extracts from the culture broth and mycelia of 6 active fungal strains towards HONE1 and HeLa cell

注: A: 菌株发酵液粗提取物对 HONE1 细胞生长的抑制率; B: 菌体粗提取物对 HONE1 细胞生长的抑制率; C: 菌株发酵液粗提取物对 HeLa 细胞生长的抑制率; D: 菌体粗提取物 HeLa 细胞生长的抑制率。
Note: A: Inhibitory effect of extracts from fungal culture broth towards HONE1 cell; B: Inhibitory effect of extracts from fungal mycelia towards HONE1 cell; C: Inhibitory effect of extracts from fungal culture broth towards HeLa cell; D: Inhibitory effect of extracts from fungal

mycelia towards HeLa cell.

株的活性成分主要存在于发酵液中(图 1), 这与苏印泉等人^[18]报道的杜仲内生真菌抗菌活性的情况相似, 表明活性成分主要是分泌胞外的次级代谢产物。

几株高活性菌株分别属于曲霉属, 链格孢属, 茎点霉属和芽枝孢属。这几个属为植物内生真菌中的较为常见的属^[10,19], 已有一些文献报道从这些属的内生真菌中分离到具有抗肿瘤活性的多种成分。如从内生真菌 *Aspergillus parasiticus* 中分离到具有细胞毒活性成分 Sequoiatones A 和 B^[20]; 从 *Alternaria* sp. 中分离到抗肿瘤药物鬼臼毒素^[21]; 从 *Phoma* sp. FL-41510 中分离到具有抗肿瘤活性的新的 Ras 法尼基转移酶抑制剂^[22]。在分离到的 4 种植物的内生真菌中银杏内生真菌的抗肿瘤活性最为显著, 这可能与银杏本身所具有的药用价值, 如抗肿瘤、抗病毒作用^[5,6]等有关。银杏中的一些活性成分, 如某些具有抗肿瘤活性的黄酮类物质可能来源于其内生真菌。因此, 作为抗肿瘤药物的一个潜在来源, 银杏内生真菌值得关注。

由于本研究旨在找寻高活性菌株, 为有效成分的分离纯化奠定基础, 因此只对 6 株高活性菌株进行了初步鉴定。活性最高的曲霉属真菌 YX5 已被确定为研究对象。关于其进一步鉴定, 扩大培养及有效成分的分离等工作有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Stierle A, Strobel G, Stierle D, *et al.* Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. *Science*, 1993, **260**(5105): 214–216.
- [2] Teles HL, Sordi R, Silva GH, *et al.* Aromatic compounds produced by *Periconia atropurpurea*, an endophytic fungus associated with *Xylopia aromatica*. *Phytochemistry*, 2006, **67**(24): 2686–2690.
- [3] Firakova S, Sturdikova M, Muckova M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia*, 2007, **62**(3): 251–257.
- [4] 欧阳天贽, 李小定, 荣建华. 真菌多糖抗肿瘤及免疫调节作用研究进展. *天然产物研究与开发*, 2006, **18**(3): 524–528.
- [5] Singh B, Kaur P, Singh GRD, *et al.* Biology and chemistry of *Ginkgo biloba*. *Fitoterapia*, 2008, **79**(6): 401–418.
- [6] Zhang YQ, Chen ARY, Li M, *et al.* Ginkgo biloba extract kaempferol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Journal of Surgical Research*, 2008, **148**(1): 17–23.
- [7] 王丽霞. 合欢的栽培技术. *特种经济动植物*, 2005, **3**(10): 28–29.
- [8] 吕金顺, 熊 波, 郭 迈, 等. 臭椿中新苦木素的结构鉴定. *中山大学学报*, 2004, **41**(3): 37.
- [9] 杨吉安, 马玉花, 苏印泉, 等. 苦楝研究现状及发展前景. *西北林学院学报*, 2004, **19**(1): 115–118.
- [10] 王 琪, 傅育红, 高锦明, 等. 苦楝内生真菌的初步分离和筛选. *西北农业学报*, 2007, **16**(2): 224–227.
- [11] 郭建新, 孙广宇, 张 荣, 等. 银杏内生真菌抗真菌活性菌株的分离和筛选. *西北农业学报*, 2005, **14**(4): 14–17.
- [12] 严铸云, 庞 蕾, 罗 静, 等. 银杏内生真菌菌种的分离及鉴定. *华西药杂志*, 2006, **21**(5): 425–427.
- [13] Barnett HL, Hunter BB. Illustrated genera of imperfect fungi. Macmillan, New York, 1987.
- [14] 黄璐琦, 杨 滨, 王 敏, 等. 当前我国药用植物资源开发利用研究中几个问题的探讨. *中国中药杂志*, 1999, **24**(2): 70–73.
- [15] Morita H, Yoshinaga M, Kobayashi J. Cephalozomines G, H, J, K, L, and M, new alkaloids from *Cephalotaxus haringtonia* var. *nana*. *Tetrahedron*, 2002, **58**(27): 5489–5495.
- [16] Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, *et al.* Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2005, **13**(21): 5892–5908.
- [17] 李海燕, 刘 丽, 魏大巧, 等. 云南 12 种药用植物内生真菌分离及抗肿瘤活性菌株筛选. *天然产物研究与开发*, 2007, **19**(5): 765–771.
- [18] 苏印泉, 朱红薇, 马希汉, 等. 杜仲内生真菌的抑菌活性筛选. *西北植物学报*, 2005, **25**(6): 1153–1157.
- [19] 刘爱荣, 吴晓鹏, 徐 同. 红树林内生真菌研究进展. *应用生态学报*, 2007, **18**(4): 912–918.
- [20] Stierle AA, Stierle DB, Bugni T. Sequoiatones A and B: novel antitumor metabolites of a redwood endophyte. *Journal of Organic Chemistry*, 1999, **64**(15): 5479–5484.
- [21] 杨显志, 郭仕平, 张玲琪, 等. 鬼臼类植物产鬼臼毒素内生真菌的筛选. *天然产物研究与开发*, 2003, **15**(5): 419–422.
- [22] 王永中, 肖亚中. 植物内生菌及其活性代谢产物. *生物学杂志*, 2004, **21**(4): 1–5.