

三种药用植物内生菌的分离及其 抗肿瘤活性菌株的筛选

陈传文^{1,2} 孙前光¹ 朱军¹ 吴晓鹏¹ 黄惠琴¹ 鲍时翔^{1*}

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海南 海口 571101)

(2. 海南大学农学院 海南 海口 570228)

摘要: 对 204 株分离自长春花、海南粗榧和见血封喉的内生菌进行了抗肿瘤活性筛选。结果显示, 有 19 株内生菌的发酵液至少对一种指示瘤株具有细胞毒活性, 其中 4 株菌的发酵液对 S180 的抑制率较强, 均在 70% 以上。研究表明菌株 PA09006 和 PA09009 发酵液中的抗肿瘤活性物质, 具有一定的酸碱耐受性, 并且对温度和紫外线具有一定的稳定性。

关键词: 长春花, 海南粗榧, 见血封喉, 内生菌, 细胞毒活性

Isolation and Screening for Endophyte with Antitumor Activities from Three Medicinal Plants

CHEN Chuan-Wen^{1,2} SUN Qian-Guang¹ ZHU Jun¹ WU Xiao-Peng¹
HUANG Hui-Qin¹ BAO Shi-Xiang^{1*}

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou, Hainan 571101, China)

(2. College of Agriculture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Two hundred and four endophytes isolated from *Catharanthus roseus*, *Cephalotaxus hainanensis* and *Antiaris toxicaria* were screened for antitumor activities. The results showed that broth of 19 strains presented cytotoxic activities to at least one of the tested tumor cells, four of them exhibited strong antitumor activity against S180, were above 70%. Studies have shown that broth in the antitumor active substances of strains PA09006 and PA09009, confer a certain to pH value and ultraviolet.

Keywords: *Catharanthus roseus*, *Cephalotaxus hainanensis*, *Antiaris toxicaria*, Endophyte, Cytotoxic activity

植物内生菌 (Endophyte) 一词于 1866 年由 DeBary 首先提出, 是指生活史中某一阶段生活在植物组织内, 对植物没有引起明显病害症状的一类微生物, 包括内生真菌、内生细菌和内生放线菌, 可从经过严格表面消毒的植物组织或植物组织内部分

离得到^[1]。1993 年美国蒙大拿州立大学的 Stierle 等人^[2]首次从短叶红豆杉 (*Taxus Nutt*) 的韧皮部中分离到一株产抗癌物质紫杉醇 (Taxol) 的内生真菌 (*Taxomyces andreanae*), 掀起了药用植物内生菌的研究热潮。目前从药用植物内生菌中寻找到的抗肿

瘤活性成分主要有萜类(紫杉醇、紫杉烷等)、生物碱类(长春新碱、细胞松弛素等)、鬼臼毒素类、黄酮类等^[3]。

本文对长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don、海南粗榧 *Cephalotaxus hainanensis* L.和见血封喉 *Antiaris toxicaria* (Pers) Lesch. 3种药用植物内生菌进行分离,并通过四甲基偶氮唑盐比色法(Metsatalousministerion MTT)筛选具有抗肿瘤活性的内生菌菌株,旨在为抗肿瘤的天然活性成分开发提供新的资源。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 分离材料: 长春花 *C. roseus*, 海南粗榧 *C. hainanensis* 和见血封喉 *A. toxicaria* 采自海南省儋州市中国热带农业科学院南药种质圃。

1.1.2 肿瘤细胞: 人肝癌细胞 SMMC-7721、小鼠肉瘤细胞 S180 均购于中科院上海生命科学研究院细胞库。

1.1.3 培养基: 分别采用牛肉膏蛋白胨培养基(NA)^[4]、高氏一号合成培养基^[4]和马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)^[4]对细菌、放线菌和真菌进行分离。倒平板前高氏一号合成培养基加入终浓度为 50 mg/L 的重铬酸钾, PDA 加入终浓度为 100 U/mL 的青霉素和硫酸链霉素。发酵培养基分别采用 NA 液体培养基^[4]、大豆粉玉米粉培养基(大豆粉 10.0 g, 玉米粉 10.0 g, 可溶性淀粉 5.0 g, KH₂PO₄ 0.5 g, 定容至 1 L, 调 pH 7.2)。马铃薯葡萄糖培养基^[4]对细菌、放线菌和真菌进行发酵。肿瘤细胞培养采用 RPMI1640 完全培养基(购于上海晶天生物科技有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 内生菌的分离纯化: 采用组织块法^[5]对 3 种药用植物内生菌进行分离。取采集的新鲜样品,用蒸馏水将植物表面洗净,稍干后取其根、茎、叶切成适宜大小的小段,在 75%乙醇中浸泡 1 min,无菌水漂洗 3 次后用 0.1%升汞消毒,茎、叶消毒 5 min,根消毒 8 min,最后再用无菌水冲洗 3-4 次,无菌滤纸吸干。去边缘,切成约 0.5 cm × 0.5 cm 的小块贴放于分离培养基上,每皿 4-6 块,细菌分离置于 37°C,真菌和放线菌分离置于 28°C 恒温培养箱中培养,其中细菌培养 2-5 d,真菌培养 5-10 d,放线菌培养 5-20 d。待培养基上植物组织周围长出菌落后,

挑取转移至新的培养基平板上,划线法纯化。

设两类空白对照,一类采用漂洗液检验法,另一类采用组织印迹法^[6]。以上两种对照处理的分离培养基平板上无菌落出现,表明植物材料表面消毒彻底,分离到的是内生菌。

1.2.2 菌株的发酵培养与待测样品的制备: 菌株的发酵采用液体培养基摇床培养,挑取纯化后的内生菌,接种于装有 100 mL 发酵培养液的 500 mL 三角瓶中,置于 200 r/min 摇床培养,细菌于 37°C 培养 3 d、真菌和放线菌于 28°C 培养 7 d 后,10000 r/min 离心 10 min,取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜无菌过滤即为发酵液样品。发酵液除去菌体,滤液用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,合并有机相,40°C 减压浓缩后将残余物溶于 DMSO 中,配成浓度为 100 mg/L 的溶液即为发酵液粗提物样品;离心得到的菌体,用适量无水乙醇超声萃取 3 次,合并乙醇相,减压浓缩后残余物溶于 DMSO 中,配成浓度为 100 mg/L 的溶液即为菌体粗提物样品。置 4°C 冰箱保存用于活性检测。

1.2.3 抗肿瘤活性菌株筛选(MTT法)^[7]: 以无菌生理盐水为阴性对照,用 Multiskan MK3 酶标仪测量各孔的 OD 值(测量波长为 492 nm)。根据各孔 OD 值,求算样品对肿瘤细胞生长的抑制率(IR): $IR = (1 - \text{待测样品 } OD_{492} \text{ 值} / \text{空白对照 } OD_{492} \text{ 值}) \times 100\%$ 。以上待测样品重复 3 次实验,结果取其平均值。

1.2.4 菌株发酵液抗肿瘤活性物质的稳定性试验: (1) 不同处理温度对菌株代谢产物活性的影响: 分别于常温(25°C)、40°C、60°C、80°C 和 100°C 水浴处理发酵样品 1 h 并测活。以上待测样品重复 3 次实验,结果取其平均值。考察不同温度对代谢产物活性的影响。

(2) 不同 pH 对菌株代谢产物活性的影响: 分别调节发酵上清液 pH 值为 3.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、11.0 于 4°C,放置 2 d 后再调 pH 至 7 测活,以上待测样品重复 3 次实验,结果取其平均值。考察活性物质对酸碱的耐受程度。

(3) 不同紫外线照射时间对菌株代谢产物活性的影响: 将发酵样品置于无菌培养皿中不加盖,于 15 W 紫外灯下 30 cm 处照射 10、20、30、40、50、60 min 后测活。以上待测样品重复 3 次实验,结果取其平均值。考察不同紫外线照射时间对代谢产物活性的影响。

2 结果与分析

2.1 内生菌的分离

从3种药用植物长春花、海南粗榧和见血封喉中共分离到内生菌204株(表1)。其中长春花中分离到的内生菌数量较多,约占总数的55.4%,海南粗榧因未对其根部内生菌进行分离,故分离到的菌株数量较少,仅占13.2%。不同部位分离到的菌株数量依次为:长春花叶片 > 茎部 > 根部;海南粗榧茎部 > 叶片;见血封喉茎部 > 根部 > 叶片。分离到不同类别的菌株数量依次为:长春花细菌 > 真菌 > 放线菌;海南粗榧真菌 > 细菌 > 放线菌;见血封喉真菌 > 细菌 > 放线菌。并首次从3种药用植物中分离到内生放线菌共30株,其中13株分离自根部,14株分离自茎部,约占放线菌总分离株数的43.3%和46.7%。其中长春花分得20株,海南粗榧分得1株,见血封喉分得9株。

2.2 内生菌的抗肿瘤活性

采用MTT法对204株内生菌的抗肿瘤活性进行了初步筛选,有19株分离自不同植物不同部位的内生菌至少对一种指示瘤株显示了细胞毒活性(表3),其宿主分布为长春花占42.1%、海南粗榧占26.3%、见血封喉占31.6%(表2)。其中,菌株PF09005、PA09006、PA09008和PA09009的发酵液对S180的抑制率较高,分别为83.2%、74.6%、72.5%和78.3%。

2.3 高活性放线菌株发酵液中抗肿瘤活性物质的稳定性

研究结果显示(图1-3),菌株PA09006和PA09009的发酵液在常温(25°C)至100°C高温处理1h、紫外线照射10-60min后其细胞毒活性并未显著降低,表现出一定的稳定性。在酸碱耐受程度方面,菌株PA09006、PA09008和PA09009发酵液分别在pH 5-7、pH 5-8和pH 6-11时相对稳定。并且菌株的活性成分主要存在于发酵液中(图4)。

表1 3种药用植物内生菌宿主分布情况
Table 1 The distribution of endophytes from 3 kinds of medicinal plants

菌株 Strain	宿主分布 Host distribution									合计(株) Total (strains)
	长春花 <i>C. roseus</i>			海南粗榧 <i>C. hainanensis</i>		见血封喉 <i>A. toxicaria</i>				
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaves	茎 Stem	叶 Leaves	根 Root	茎 Stem	叶 Leaves		
真菌 Fungus	3	12	29	7	13	8	18	14	104	
细菌 Bacterium	10	23	16	6	0	7	7	1	70	
放线菌 Actinomycetes	7	11	2	1	0	6	2	1	30	
合计(株) Total (strains)	113			27		64			204	

表2 3种药用植物内生菌细胞毒活性菌株的宿主分布情况
Table 2 The distribution of cytotoxic activity of endophyte from 3 kinds of medicinal plants

菌株 Strain	宿主分布 Host distribution									合计(株) Total (strains)
	长春花 <i>C. roseus</i>			海南粗榧 <i>C. hainanensis</i>		见血封喉 <i>A. toxicaria</i>				
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaves	茎 Stem	叶 Leaves	根 Root	茎 Stem	叶 Leaves		
真菌 Fungus	0	1	2	1	3	1	3	1	12	
细菌 Bacterium	0	0	0	1	0	1	0	0	2	
放线菌 Actinomycetes	1	4	0	0	0	0	0	0	5	
合计(株) Total (strains)	8			5		6			19	

表3 3种药用植物内生菌的细胞毒活性
Table 3 The cytotoxic activity of endophytes from 3 kinds of medicinal plants

宿主植物 Host plant	类别 Type	菌株编号 Strain Code	抑制率 Inhibitory rate (%)	
			SMMC-7721	S180
长春花 <i>C. roseus</i>	放线菌	PA09003	51.3	68.3
	放线菌	PA09005	47.2	69.1
	放线菌	PA09006	58.6	74.6
	放线菌	PA09008	52.1	72.5
	放线菌	PA09009	67.9	78.3
	真菌	PF09005	66.2	83.2
	真菌	PF09009	43.1	52.5
	真菌	PF09010	49.2	50.6
	海南粗榧 <i>C. hainanensis</i>	细菌	PB09601	61.3
真菌		PF09602	55.7	40.5
真菌		PF09603	53.6	41.9
真菌		PF09604	57.8	65.3
真菌		PF09605	40.2	54.2
见血封喉 <i>A. toxicaria</i>	细菌	PB09701	46.1	61.9
	真菌	PF09704	50.4	61.2
	真菌	PF09701	63.7	59.6
	真菌	PF09702	66.2	59.3
	真菌	PF09705	41.5	50.3
	真菌	PF09703	54.6	62.7

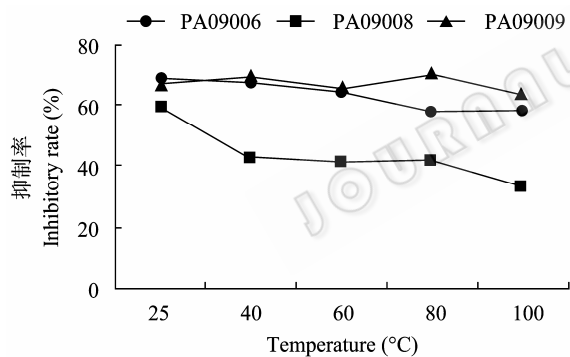


图1 活性物质热稳定性

Fig. 1 The stability of active compounds at different temperatures

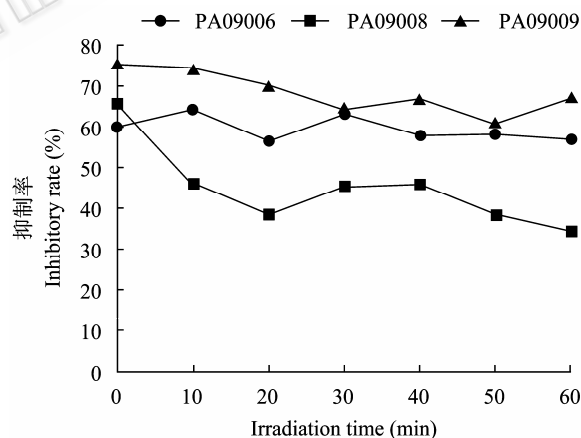


图3 活性物质紫外线稳定性

Fig. 3 The stability of active compounds in ultraviolet radiation

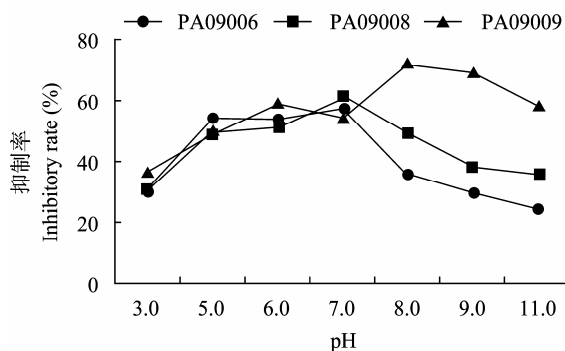


图2 活性物质酸碱稳定性

Fig. 2 The stability of active compounds at different pH value

3 讨论

迄今人们已从药用植物中成功地开发出了紫杉醇、三尖杉碱、长春碱、长春新碱等抗肿瘤新药^[8-10]。但由于物种资源稀少及生态保护等问题,制约了天然药物的进一步开发和利用。药用植物内生菌的研究和开发为这一问题的解决提供了一条有效的途径。本文研究结果表明,长春花、海南粗榧和见血

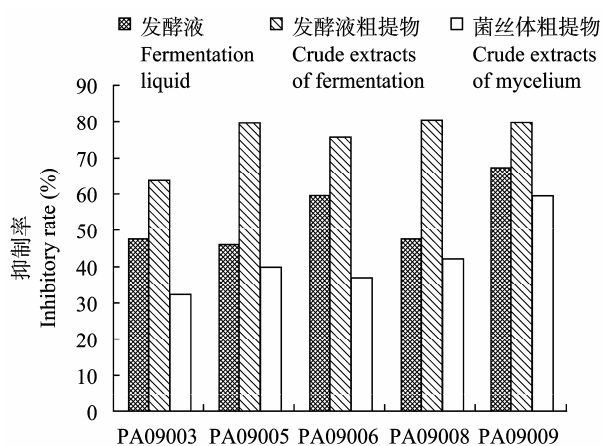


图4 五株长春花内生放线菌细胞毒活性
Fig. 4 The cytotoxic activity of 5 endophytic actinomycetes from *C. roseus*

封喉中具有抗肿瘤活性的菌株, 约占总分离菌株数的 9.3%。在分离的 3 种植物的内生菌中长春花内生放线菌的抗肿瘤活性菌株所占比率较高, 占长春花内生放线菌总数的 25%, 并且抗肿瘤活性相对较高, 因此, 作为抗肿瘤药物的一个潜在来源, 药用植物内生菌值得关注。

研究表明, 菌株 PA09006 和 PA09009 的抗肿瘤活性成分分别在 pH 5-7 和 pH 6-11 时相对稳定, 同时对温度和紫外线相对稳定, 并且菌株的活性成分主要存在于发酵液中, 这与缪莉^[11]等人报道的 6 株内生真菌(YX5、YX17、YX36、KL1、CC1、CC5)的细胞毒活性及苏印泉^[12]等人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, 其生物活性成分值得进一步研究。由于本研究旨在寻找高活性菌株, 为有效成分的分离纯化奠定基础, 因此只对 3 株相对高活性的长春花内生放线菌菌株进行了活性物质的稳定性研究。关于其分类鉴定, 扩大培养及有效成分的分离纯化等工作有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会, 中国药典. 北京: 化学工业出版社, 2005: 2731.
- [2] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew (*Taxus brevifolia*). *Science*, 1993, **260**(5105): 214-216.
- [3] 王利国, 潘超美, 贺红, 等. 抗肿瘤药用植物及其内生菌活性代谢产物研究进展. 广州中医药大学学报, 2008, **25**(2): 183-186.
- [4] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [5] 严铸云, 庞蕾, 罗静, 等. 银杏内生真菌菌种的分离及鉴定. 华西药理学杂志, 2006, **21**(5): 425-427.
- [6] 何佳, 刘笑洁, 赵启美, 等. 植物内生真菌分离方法的研究. 食品科学, 2009, **30**(15): 180-183.
- [7] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol Methods*, 1983(65): 55-63.
- [8] 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.
- [9] Morita H, Yoshinaga M, Kobayashi J. Cephalozomines G, H, J, K, L, and M, new alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia* var. *nana*. *Tetrahedron*, 2002, **58**(27): 5489-5495.
- [10] 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.
- [11] 缪莉, 王元元, 朱磊, 等. 四种植物内生真菌的分离及其抗肿瘤活性的筛选. 微生物学通报, 2009, **36**(6): 865-869.
- [12] 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.