

西藏林芝土壤放线菌抗肿瘤活性菌的筛选及鉴定

谢静 李大攀 林爱洋 杨秀萍*

(首都师范大学 生命科学学院 北京 100048)

摘要: 【目的】筛选并鉴定西藏林芝八一镇土壤中产生抗肿瘤活性物质的放线菌。【方法】用平板稀释法分离放线菌,用 MTT 法和纸碟法对放线菌发酵产物进行体外抗肿瘤与抑菌活性检测,并用多相分类技术对抗肿瘤活性菌株进行鉴定。【结果】共分离出 29 株放线菌,得到 6 个抑制体外肿瘤细胞增殖的活性菌株(20.7%),同时它们也具有抑菌活性,其中 4 株菌的检测样品对 Hela 细胞的抑制率达 80%以上。多相分类研究表明,6 个活性菌株分别隶属于链霉菌属(*Streptomyces*)的 3 个已知物种的变种。【结论】林芝八一镇土壤放线菌中蕴藏着丰富的抗肿瘤活性链霉菌,是一个潜在的抗肿瘤药用微生物资源。

关键词: 西藏, 林芝, 放线菌, 链霉菌, 抗微生物, 抗肿瘤, 多相分类

Screening and identification for antitumor actinobacteria isolated from the soil of Nyingchi in Tibet

XIE Jing LI Da-Pan LIN Ai-Yang YANG Xiu-Ping*

(School of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: [Objective] This study was aimed to isolate and identify the actinobacteria with antitumor activity isolated from a soil sample collected from the Ba-yi town, Nyingchi, Tibet, China. [Methods] Actinobacteria were isolated and purified by agar plate dilution method planting in Gause 1 and glucose/asparagines agar media. To test the biological active effects *in vitro* of the actinobacteria fermentations and its' crude extracts, we used MTT assay with 5 human tumor cell lines to monitor the antitumor activity, paper-dish method with 7 indicative microorganism strains (bacteria and fungi), and 4 antibiotics to detect the antimicrobial activ-

基金项目: 国家植物学重点学科建设项目

*通讯作者: Tel: 86-10-68903434; 信箱: yangxp2008@126.com

收稿日期: 2012-12-13; 接受日期: 2013-03-01

ity and resistance. The polyphasic taxonomies of the antitumor active strains were studied according to morphological, cultural, physiological, biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis. **[Results]** We isolated 29 actinobacteria strains of which 6 strains with good antitumor activities were obtained (20.7%). All of the crude extracts of the 6 strains had remarkable inhibiting effects against the 5 human tumor cell lines and different degrees of antimicrobial activity against the indicator microorganisms. The crude sample of 4 of them had the inhibition rate of more than 80% on Hela cell line. Only one active strain had good tolerance for 4 kinds of antibiotics. Taxonomic studies showed that all of the 6 antitumor active strains were related to *Streptomyces*. These 6 strains may be variants of the three known *Streptomyces* species (*Streptomyces galbus*, *Streptomyces mirabilis*, *Streptomyces olivochromogenes*) respectively. **[Conclusion]** The actinobacteria in Ba-yi town of Nyingchi are rich in *Streptomyces* with antitumor activities and may be a potential microbial resource for antitumor drugs.

Keywords: Tibet, Nyingchi, Actinobacteria, *Streptomyces*, Antimicrobial, Antitumor, Polyphasic systematics

目前,特殊生态环境中的微生物已经成为一类潜在的生物活性物质资源库,在抗肿瘤活性化合物的研究开发中也具有明显优势。那广水等报道北极微生物中6.2%的菌株有抗肿瘤活性^[1];朱天骄等对南极微生物的研究表明,11%的微生物具有显著的抗肿瘤活性,其中的放线菌有17%的菌株为抗肿瘤活性菌^[2-3];韩晓等从天津海洋样本中得到的放线菌有21.2%具有抗肿瘤活性,并且从放线菌中获得抗肿瘤活性菌株的频率远远高于真菌(5%)^[4];陈义光等发现青海盐碱土或泥样本中的放线菌有17.9%具抗肿瘤活性^[5]。以往的研究显示,放线菌是产生天然药物最多的一类微生物,临床及农业上应用的抗生素有75%是由放线菌产生的^[6],而上述学者的研究表明,极端环境微生物具有高比例的抗肿瘤活性菌株,且显示放线菌仍然是抗肿瘤活性物质的主要来源,人们也不断从中发现新的抗肿瘤活性物质和丰富的先导化合物^[3,7]。

科学界把北极、南极和青藏高原并称为“地球三极”。西藏得天独厚的气候条件赋予了该地

区丰富多样的土壤微生物及新化合物资源^[8-10],引起了研究者的广泛关注。之前我们对西藏北部卡拉山的雪线土壤放线菌进行分离研究,从14株链霉菌中得到一株放线菌素X2的产生菌^[11-12],为了扩大筛选,发掘新的抗肿瘤活性物质产生菌(以下简称为活性菌),本课题组对采集于林芝八一镇地区针阔混交林下的潮湿土壤进行放线菌的分离,从中筛选活性菌,确定菌种发酵粗提物的体外抗肿瘤与抗菌活性,并对活性菌株进行多相分类研究,以确定它们的分类地位。

1 材料与方法

1.1 土样来源及菌种分离

土壤样本一份,于2010年9月2日采集于海拔3 018 m,北纬29.765 87,东经94.246 81的西藏林芝八一镇地区的针阔混交林下,置于无菌塑料离心管中保存于4℃备用。用无菌生理盐水将土样制成土壤悬液,用平板稀释法在葡萄糖-天门冬素和高氏一号培养基平板上分

离纯化放线菌, 28 °C 培养 7–14 d 至单菌落出现。将纯化的单菌落转接入高氏一号斜面培养基编号, 28 °C 培养至生长茂盛后置 4 °C 贮存待用。

1.2 靶肿瘤细胞株及指示菌

5 个人肿瘤细胞系, 包括: 人非小细胞肺癌 A549 细胞系、人乳腺癌 MCF-7 细胞系、人宫颈癌 HeLa 细胞系、人结肠癌 HT-29 细胞系与人低分化结肠腺癌 HCT-116 细胞系, 均由首都师范大学生命科学学院许兴智教授惠赠; 7 个微生物指示菌(细菌与真菌), 包括金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) ATCC 19115、变形杆菌(*Proteus mirabilis*) ATCC 49132、沙门氏菌(*Salmonella*) ATCC 14028、白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231、深红酵母(*Rhodotorula rubra*) ACCC 20252 和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) ATCC 6633, 由首都师范大学生命科学学院实验教学示范中心微生物学实验室提供。

1.3 菌种发酵

发酵培养基组成(g/L): 小带鱼蛋白胨 2, 酵母粉 3, 硝酸钠 1, 糊精 10, 葡萄糖 10, 碘化钾 0.1, 蒸馏水 1.0 L, pH 7.2–7.4。将分离纯化的放线菌接种于装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 °C、180 r/min 摇床振荡培养 7 d。发酵结束后, 将发酵液离心取上清备用。

1.4 菌株发酵液及其粗提物的体外抗肿瘤活性检测

采用 MTT 比色法^[13]检测菌种发酵液上清(过滤除菌)的体外抗肿瘤活性, 筛选有抑制肿瘤细胞增殖作用的菌株作为抗肿瘤活性菌。针对不同菌种选择各自适宜的溶媒(乙酸乙酯、丁醇或氯仿)对活性菌的发酵液上清等量萃取 3 次, 将萃取液合并后于 45 °C 薄膜浓缩干燥, 该粗提物作为待测样品。检测时用甲醇溶解样品,

再用 DMEM 细胞培养液将其稀释 10 倍加样(细胞培养液中甲醇的最终浓度为 1%), 检测其对体外培养的 5 个品系肿瘤细胞增殖的抑制率。

1.5 抗菌活性检测

采用纸碟法检测发酵液滤液及活性菌的粗提物样品(溶解稀释同抗肿瘤活性检测)对 7 种指示菌的生长抑制作用。将滤纸片用样品浸湿饱和, 让甲醇完全自然挥发后再置于含有指示菌的培养基平面上, 于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后观察结果, 测量抑菌圈直径。

1.6 菌种形态及培养特征观察

将上述筛选得到的活性菌, 划线接种到高氏一号平板, 用插片法观察菌落及菌丝形态结构。选用 7 种培养基(高氏一号琼脂、马铃薯琼脂、蔗糖察氏琼脂、葡萄糖-门冬酰胺琼脂、无机盐淀粉琼脂、营养琼脂与甘油天门冬酰胺琼脂)进行斜面接种, 28 °C 培养 7、14 和 21 d 后观察基内菌丝、气生菌丝的生长情况及可溶性色素的产生情况^[14]。

1.7 菌种生理生化特征及抗性检测

参照文献[14]相关方法进行生理生化特征观察; 同时检测它们对 11 种碳源的利用情况; 并设置含有 5 种不同浓度抗生素的培养基: 50、150、300、500 和 800 mg/L, 分别测定活性菌对氯霉素、卡那霉素、红霉素和新霉素的抗性。

1.8 菌种细胞壁化学成分分析

细胞壁化学成分分析方法参照 Li 等^[15]所用的方法进行。

1.9 16S rRNA 基因序列测定及系统发育树的构建

1.9.1 活性菌总 DNA 的提取: 按试剂盒(购自上海天根公司)说明对分离纯化的活性菌进行基因组 DNA 提取。

1.9.2 16S rRNA 基因扩增: 采用细菌 16S rRNA 基因通用引物(27F 和 1492R)进行 PCR 扩

增。引物 27F (*Escherichia coli* position 8–27)的序列为 5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3', 1492R (*Escherichia coli* position 1492–1510)的序列为 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'。反应条件参照文献[16]进行。PCR 产物用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测, 16S rRNA 基因序列测定交由北京理化中心完成。

1.9.3 系统发育树的构建: 从 NCBI 的 GenBank 中进行 BLAST 搜索, 调出与活性菌 16S rRNA 基因序列相似性最高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列, 用 ClustalX 进行比对; 再用 PAUP*4.0b10 进行最大简约分析(Maximum parsimony analysis, MP), 重复次数为 100^[17], 具体方法见参考文献[18]。

2 结果与分析

2.1 放线菌的分离纯化

用两种培养基共分离纯化出 29 个表型不同、长势良好的放线菌菌株。

2.2 放线菌发酵液及活性菌发酵粗提物的抗菌及抗肿瘤活性

29 株放线菌中检测到 18 株菌具有不同程度的抑菌活性, 其中 6 株菌的发酵液同时具有抑

制体外肿瘤细胞增殖活性和抑菌作用, 被定为活性菌, 编号为 LZ201001–LZ201006。

MTT 法检测显示, 6 株活性菌发酵液粗提物对 5 种体外培养的肿瘤细胞系的增殖均有不同程度的抑制作用, 其中有 5 株共同表现为对 Hela 细胞系的抑制作用最强, 4 株抑制率超过 80%, 结果见表 1。而且所有活性菌株抑制肿瘤细胞增殖的活性与其抑制枯草芽胞杆菌及其它 3 种指示菌的活性(表 2)同步, 因此, 在以后对发酵液进行抗肿瘤活性物质萃取分离时, 可以用共同拮抗的枯草芽胞杆菌作为指示菌追踪活性物质的分离。

表 2 显示了 6 株活性菌的发酵液及提取物均有广谱的抑菌效应, 也各有特点。

2.3 活性菌的形态及培养特征

6 株活性菌在 7 种不同培养基上基内菌丝、气生菌丝的发育状况及产生的可溶性色素颜色见表 3。它们在大多数培养基上生长良好, 基内菌丝发育良好, 纤细多分枝, 不形成横隔; 气生菌丝分枝, 颜色较深, 较基内菌丝略粗; 孢子丝呈直、波曲或螺旋形, 孢子为球形、椭圆形或柱形, 表面光滑。显微镜观察均具有典型的链霉菌属的形态特征。多数不产生可溶性色素。

表 1 活性菌株发酵液粗提物对枯草芽胞杆菌及肿瘤细胞增殖的体外抑制作用						
Table 1 <i>Bacillus subtilis</i> and tumor cell growth inhibition effects of the crude extracts <i>in vitro</i>						
菌株 Strain	对枯草杆菌的抑菌 圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	活性菌株发酵液粗提物对不同肿瘤细胞株的体外抑制作用(抑制率, %)				
		Tumor cell growth inhibition effects of the crude extracts <i>in vitro</i> (inhibition rate, %)				
		人非小细胞肺癌 细胞 A549 cell	人乳腺癌 细胞 MCF-7 cell	人宫颈癌 细胞 HeLa cell	人结肠癌 细胞 HT-29 cell	人低分化结肠癌 细胞 HCT-116
LZ201001	22.0	51.74	57.68	90.66	66.79	69.69
LZ201002	14.3	50.50	58.30	90.10	70.95	69.62
LZ201003	16.7	44.67	47.84	72.31	54.40	64.74
LZ201004	16.1	44.76	47.84	82.15	54.40	64.74
LZ201005	16.9	79.68	66.45	63.96	61.14	73.63
LZ201006	12.8	68.54	45.36	80.34	73.65	57.93

表 2 活性菌株的抑菌实验结果						
Table 2 Antimicrobial effects of the active strains						
指示菌 Indicative microorganisms	菌株 Strains					
	LZ201001	LZ201002	LZ201003	LZ201004	LZ201005	LZ201006
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	+	-	-
单核细胞增生李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	+	+	+	+	+	+
变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 49132	+	+	+	+	+	+
沙门氏菌 <i>Salmonella</i> ATCC 14028	+	+	+	-	-	+
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	+	+	+	+	+	+
深红酵母 <i>Rhodotorula rubra</i> ACCC 20252	-	+	-	-	-	-
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	+	+	+	+	+

注: +: 阳性结果; -: 阴性结果.
Note: +: Positive results; -: Negative results.

表 3 活性菌株的培养特征							
Table 3 Cultural characteristics of the active strains							
培养基 Medium	项目 Item	LZ201001	LZ201002	LZ201003	LZ201004	LZ201005	LZ201006
高氏一号 Gause 1	Aerial mycelium	Tan	Tan	Black	Chestnut	Black	Brown
	Substance mycelium	Lightyellow	Yellow	White	White	White	White
	Soluble pigment	None	None	None	None	None	None
察氏琼脂 Czapek's agar	Aerial mycelium	Lightyellow	None	None	None	Sandy-brown	Sandy-brown
	Substance mycelium	White	None	None	White	Tan	Tan
	Soluble pigment	None	None	None	None	None	None
葡萄糖-天冬素琼脂 Glucose/asparagines agar	Aerial mycelium	Lightyellow	Maroon	Burlywood	Tan	Brown	Black
	Substance mycelium	White	Lightyel-low	White	White	White	Chestnut
	Soluble pigment	None	Brown	Chestnut	Brown	Chestnut	Black
无机盐淀粉琼脂 Inorganic salt/starch agar (ISP 4)	Aerial mycelium	Yellow	Yellow	Black	Black	Black	Black
	Substance mycelium	Lightyellow	Palegold-enrod	White	White	White	White
	Soluble pigment	None	None	None	None	None	None
营养琼脂 Nutrient agar	Aerial mycelium	Moccasin	Tan	Lightyel-low	Lightyel-low	Lightyel-low	Black
	Substance mycelium	Lightyellow	Lightyel-low	Gainsboro	Silver	Light grey	Darkgray
	Soluble pigment	Goldenrod	Goldenrod	Goldenrod	Peru	Peru	Dark-goldenrod
甘油天冬素琼脂 Glycerol/asparagine agar (ISP 5)	Aerial mycelium	Lightyellow	Palegold-enrod	Burlywood	Lightyel-low	Cream	Tan
	Substance mycelium	White	White	White	Tan	White	White
	Soluble pigment	None	None	None	None	None	None
马铃薯提取物琼脂 Potato extract agar	Aerial mycelium	Sandybrown	Chestnut	None	None	None	Lightyel-low
	Substance mycelium	Yellow	Yellow	Black	None	None	Black
	Soluble pigment	Peru	Brown	Chestnut	None	None	Brown

2.4 活性菌的生理生化特征

6 株活性菌的生理生化特征和碳源利用情况见表 4、表 5。

从表 4 可以看出, 活性菌中纤维素水解结果显示阳性与弱阳性或可疑阳性的菌株各占 33.3%, 产硫化氢、明胶液化、牛奶凝固和胨化、硝酸盐还原结果显示阳性的菌株占 83.3%, 所有菌株均可水解淀粉。

从表 5 可以看出, 所有的活性菌都能利用葡萄糖、菊糖、山梨醇、糊精、醋酸钠、麦芽糖、D-半乳糖与可溶性淀粉, 大多数能利用乳糖、利用或弱利用蔗糖。总体上, LZ201004 基本可以利用所有的检测碳源, 其次是 LZ201001。

2.5 活性菌的抗性

对抗生素的抗性检测发现, 除 LZ201006 外, 其它菌株对所检测不同浓度的 4 种抗生素均不耐受, 而 LZ201006 对 4 种抗生素均有一定程度的耐受性, 详见表 6。

从表 6 可以看出, LZ201006 能够耐受 300 mg/L 的红霉素和 500 mg/L 氯霉素、卡那霉素与新霉素, 但在含 500 mg/L 红霉素培养基和含 800 mg/L 氯霉素、卡那霉素、新霉素的培养基里不能生长。

2.6 活性菌的细胞壁化学成分

全细胞壁氨基酸分析表明, 所有检测菌株的全细胞壁水解液均含 L-DAP、天冬氨酸、谷氨酸和甘氨酸, 属于细胞壁 I 型。全细胞壁糖成分分析显示, 所有活性菌株都含有半乳糖、葡萄糖、核糖、木糖等糖类。

2.7 活性菌的 16S rRNA 基因序列及系统发育树

6 株活性菌的 16S rRNA 基因序列长度均在 1 400–1 500 bp 之间, 与相似菌进行序列比对、相似性计算及聚类分析, 构建的系统发育树见图 1。在系统发育树上, 菌株 LZ201001 与链霉菌属 (*Streptomyces*) 的 *Streptomyces galbus* (X79325) (鲜黄链霉菌 X79325) 以 99.3% 的相似性聚在一起, 但二者具有明显不同的代谢特征, 该菌可能属于鲜黄链霉菌的变种; LZ201002 以 100% 的相似性与 *Streptomyces mirabilis* strain NBRC 13450 (奇异链霉菌 NBRC 13450) 相邻, 但其生长特点与普通的奇异链霉菌明显不同, 有可能是奇异链霉菌的一个变种; 菌株 LZ201003、LZ201004、LZ201005 彼此相邻, 它们之间的相似性达到 99.6%, 与这 3 个菌株系统发育关系最密切的是 *Streptomyces*

表 4 活性菌株的生理生化特征
Table 4 Physiological-biochemical identification of the active strains

项目 Item	LZ201001	LZ201002	LZ201003	LZ201004	LZ201005	LZ201006
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	++	+	+	—	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+
纤维素水解 Cellulose hydrolysis	±	±	—	+	—	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	—	+	+	+	+	+
牛奶固氮化 Milk peptonization	—	+	+	+	+	+
硫化氢产生 Hydrogen sulfide test	—	+	+	++	+	++

注: +: 阳性结果; —: 阴性结果; ±: 弱阳性或可疑阳性。

Note: +: Positive results; —: Negative results; ±: Weak positive or questionable positive results.

表 5 活性菌株对部分碳源的利用情况						
Table 5 Utilization of the carbon source by the active strains						
项目 Item	LZ201001	LZ201002	LZ201003	LZ201004	LZ201005	LZ201006
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	—	±	+	±	±
菊糖 Synanthrin	+	+	+	+	+	+
柠檬酸钠 Sodium citrate	±	±	—	±	—	±
山梨醇 Sorbito	±	+	+	+	+	+
糊精 Dextrin	+	+	+	+	+	+
醋酸钠 Sodium acetate	+	+	+	+	+	+
乳糖 Lactose	+	+	+	+	+	—
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	+	+
D-半乳糖 D-Galactose	+	+	+	+	+	+
可溶性淀粉 Soluble starch	+	+	+	+	+	+

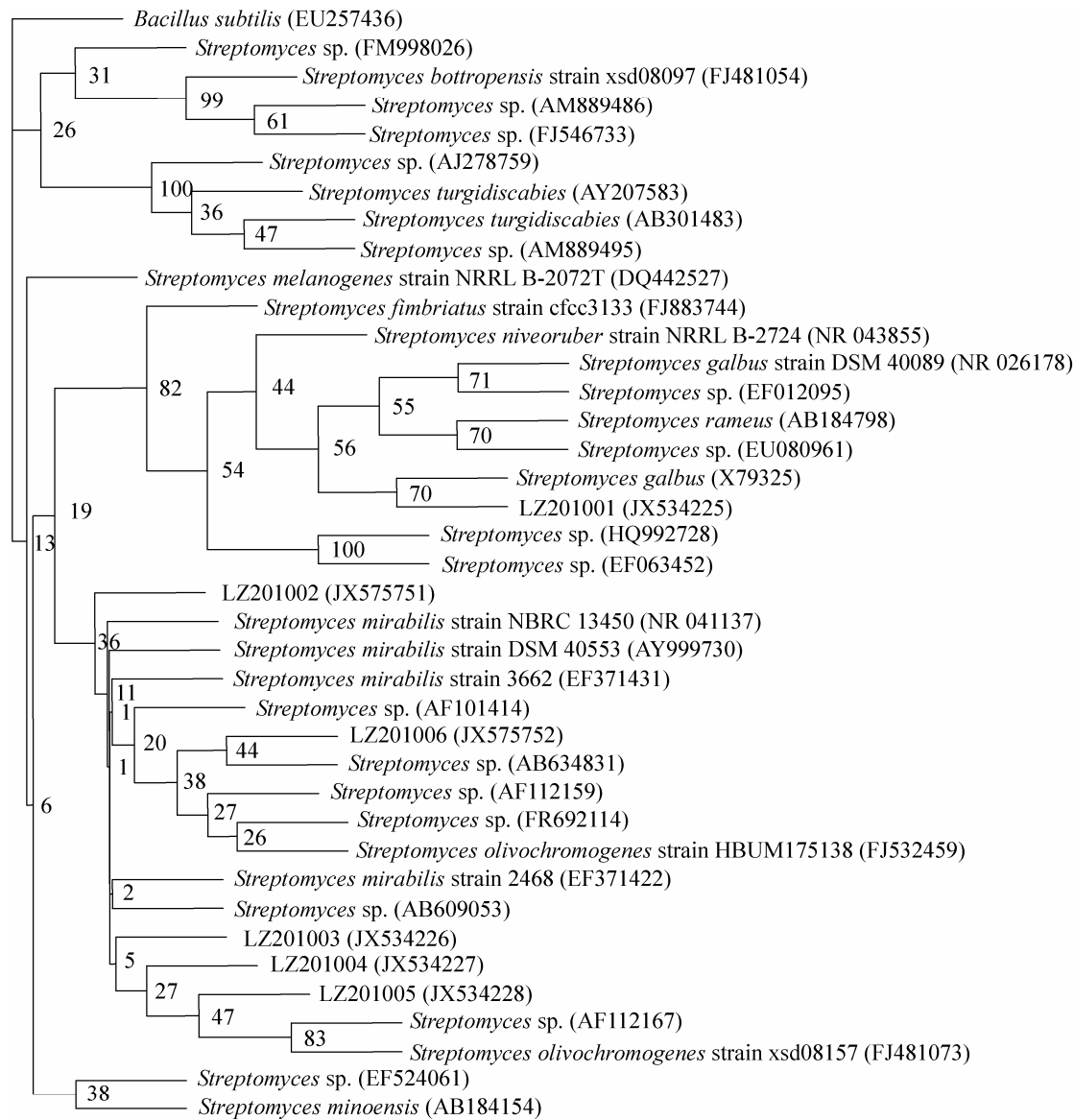
注: +: 阳性结果; —: 阴性结果; ±: 弱阳性或可疑阳性.
Note: +: Positive results; —: Negative results; ±: Weak positive or questionable positive results.

表 6 活性菌株 LZ201006 对抗生素的抗性					
Table 6 Resistance of the active strain LZ201006 to different antibiotics					
抗生素 Antibiotics	抗生素浓度 The concentration of antibiotics (μg/L)				
	50	150	300	500	800
红霉素 Erythromycin	+	+	+	—	—
氯霉素 Paraxin	+	+	+	+	—
卡那霉素 Kanamycin	+	+	+	+	—
新霉素 Neomycin	+	+	+	+	—

注: +: 阳性结果; —: 阴性结果.
Note: +: Positive results; —: Negative results.

olivochromogenes strain xsd08157 (橄榄色链霉菌 xsd08157), 相似性分别为 99.1%、99.2%、99.6%, 结合菌株的形态和培养特征, 分析其生理生化特征, 3 株活性菌株与橄榄色链霉菌均有不同程度的差异, 可能是橄榄色链霉菌的 3 个变种;

LZ201006 和 *Streptomyces olivochromogenes* strain HBUM175138 (橄榄色链霉菌 HBUM175138)以 99.1%的 16S rRNA 基因序列相似性在同一个大分支中, 综合其生理生化特征, 暂时定为橄榄色链霉菌的变种。



10

图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的 6 株菌株及其相关种、属的系统发育进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed showing the phylogenetic relationships among 6 strains and other related *Streptomyces* strains based on 16S rRNA gene sequences downloaded from GenBank

注: 括号中的序号表示 GenBank 收录号; 分支上的数字表示 Bootstrap 值; 标尺表示分支长度。

Note: The numbers in parenthesis represent GenBank accession numbers. The numbers on each branch indicate the bootstrap values (100 bootstrap replicates). The scale bar defines branch length.

3 讨论

随着人们对微生物来源药物需求的不断增加, 以及对普通环境微生物的普遍筛选, 同时

为了减少活性物质的重复发现率, 驱使人们把眼光转向具有丰富物种多样性、基因和代谢机制多样性的极端环境中去寻找新的药用活性物质及资源。本实验从林芝八一镇地区的针阔混

交林下的土壤里分离到的 29 株不同表型的放线菌中筛选到 6 株抗肿瘤活性物质产生菌, 阳性率为 20.7%, 高比例的活性菌筛选率与朱天骄、韩晓及陈义光等^[3-5]对极端环境放线菌的筛选结果类似, 这些研究结果也充分显示了极端环境中的微生物资源在抗肿瘤活性物质研究方面具有极大的潜力, 即使是在林芝八一镇环境相对缓和的地区也如此, 而放线菌仍不失为产生生物活性物质的主要微生物库。

从菌落形态上看, 分离出来的 29 株放线菌都属于链霉菌属(*Streptomyces*)。根据菌种的形态特征、生理生化特征、细胞壁分析等结果, 依据《放线菌系统学》^[14], 结合系统发育的结果, 可以判定 6 株抗肿瘤活性菌株全部属于链霉菌。

基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析显示, 菌株 LZ201001 与已知鲜黄链霉菌(X79325)以 99.3%的相似性聚在一起, 但二者具有明显不同的代谢特征, 菌株 LZ201001 可利用纤维素, 不胨化牛奶, 不产生硫化氢, 在多数培养基上不产生可溶性色素, 仅在营养琼脂及土豆培养基上有金麒麟色及秘鲁色色素产生, 与鲜黄链霉菌明显不同^[19], 结合其生长特征比较也有区别, 该菌可能属于鲜黄链霉菌的变种。LZ201002 虽与奇异链霉菌 NBRC 13450 的 16S rRNA 基因序列 100%相似, 但其生长特点与普通的奇异链霉菌明显不同, 除在察氏培养基上不生长外, 其他培养基上气生菌丝生长良好, 有可能是奇异链霉菌的一个变种。菌株 LZ201003、LZ201004 和 LZ201005 聚在一起, 它们与橄榄色链霉菌 xsd08157 的相似性分别为 99.1%、99.2%、99.6%; 结合菌株的形态和培养特征, 分析其生理生化特征, 与橄榄色链霉菌均有不同程度的差异, 例如 LZ201003 在甘油天冬素培养基上产生实木色气生菌丝、LZ201004 水解纤维素良好、LZ201005 不可以

液化明胶, 且 LZ201004 和 LZ201005 在马铃薯培养基上均不能产生可溶性色素等; 因此它们可能是橄榄色链霉菌的 3 个变种。LZ201006 和橄榄色链霉菌 HBUM175138 以 99.1%的 16S rRNA 基因序列相似性同在一个大分支中, 综合其生理生化特征, 与橄榄色链霉菌大致相同, 但由于其对抗生素有较好的抗性, 所以暂时定为橄榄色链霉菌变种。综上所述, 6 个抗肿瘤活性阳性菌株可能代表了 3 个已知物种的变种, 这一结果也说明了特殊环境使得其中的微生物具有丰富的物种多样性和基因多样性, 在一些特殊环境下可能存在较为丰富的可培养的微生物多样性, 这一结果和陈义光等^[5]的研究结果类似。

体外抗肿瘤活性检测显示, 6 个活性菌株均具有广谱的抑制肿瘤细胞生长的作用, 多数活性菌株都对 HeLa 细胞作用最强, 有 4 株抑制率在 80%以上, 其中 2 株在 90%以上, 可作为宫颈癌化疗药物开发的潜在资源。LZ201005 则对非小细胞肺癌 A549 的抑制作用最强, 抑制率达 80%左右, 对 HCT-116 与 MCF-7 的抑制作用也较其他菌株强, 针对非小细胞肺癌临床化疗效果较差的现状, LZ201005 有可能为临床相应肿瘤的治疗提供可选择有特点的新药开发资源。LZ201006 对体外肿瘤细胞均具有不同程度的抑制作用, 除 HeLa 细胞外, 对人结肠癌细胞 HT-29 的抑制作用也较其他菌株强, 抑制率在 75%左右, 可以作为结肠癌的备选药物开发资源; 并且该菌对氯霉素、卡那霉素、红霉素和新霉素 4 种抗生素也均有较好的耐受性, 而其他 5 株活性菌则不耐受, 证明该菌株有更为独特的代谢模式, 可能具有在其他方面进一步研究开发的价值和潜力。与此同时, 6 株活性菌也具有广谱的抗菌作用, 普遍对抗单核细胞增生李斯特菌、变形杆菌、白色念珠菌、枯草芽孢

杆菌; LZ201001、LZ201002、LZ201003、LZ201006 均能抑制沙门氏菌; 另有 LZ201004 可对抗金黄色葡萄球菌, LZ201002 可抑制深红酵母菌, 可能在临床感染控制或其他方面具有一定的应用价值。

综上所述, 本实验从西藏林芝八一镇地区土壤中获得 6 株抗肿瘤活性菌代表了链霉菌属的 3 个已知物种(鲜黄链霉菌、奇异链霉菌和橄榄色链霉菌)的不同变种, 它们均具有不同特点的广谱抗瘤和抗菌活性。这一结果也佐证了极端环境中的微生物具有丰富的物种多样性和基因多样性, 在抗肿瘤或其他生物活性物质的筛选上极具潜力。

参 考 文 献

- [1] 那广水, 周传光, 叶亮, 等. 北极微生物的分离及抗菌抗肿瘤活性筛选[J]. 水产科学, 2008, 27(8): 414-416.
- [2] 朱天骄, 顾谦群, 朱伟明, 等. 南极微生物的分离及抗肿瘤活性筛选[J]. 中国海洋药物, 2006, 25(1): 25-27.
- [3] 朱天骄. 南极放线菌药用资源的调查及次级代谢产物研究[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2009.
- [4] 韩晓, 崔承彬, 韩小贤. 海洋来源微生物的分离培养与抗肿瘤活性筛选[J]. 国际药学研究杂志, 2008, 35(4): 241-246.
- [5] 陈义光, 姜怡, 李文均, 等. 青海盐碱环境中具抗肿瘤活性放线菌的筛选和多样性研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(5): 757-762.
- [6] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites, a personal review[J]. The Journal of Antibiotics, 2005, 58(1): 1-26.
- [7] 李冬, 朱伟明, 顾谦群, 等. 海洋放线菌 H2003代谢产物中环二肽成分及其抗肿瘤活性的初步研究[J]. 海洋学报, 2007, 31(5): 45-48.
- [8] 卢晓飞. 西藏米拉山高寒草甸土壤微生物多样性研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2009.
- [9] 罗红丽, 黄英, 王黎明, 等. 西藏地区土壤放线菌群多样性及拮抗活性研究[J]. 微生物学报, 2005, 45(5): 724-727.
- [10] 曹艳茹, 姜怡, 徐丽华. 大香格里拉土壤放线菌组成分析及生物活性测定[J]. 微生物学报, 2009, 49(1): 105-109.
- [11] 张迎春, 阚丽娟, 刘少佳, 等. 西藏卡拉山土样中放线菌的多相分类研究[J]. 生物技术通报, 2008(6): 179-183.
- [12] 孙肇暘, 张明明, 秦德华, 等. 放线菌 Z802031次级代谢产物放线菌素 X2的研究[J]. 首都师范大学学报: 自然科学版, 2011, 32(3): 18-22.
- [13] Twentyman PR, Fox NE, Rees JK. Chemosensitivity testing of fresh leukaemia cells using the MTT colorimetric assay[J]. British Journal of Haematology, 1989, 71(1): 19-24.
- [14] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学——原理、方法及实践[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 40-47, 66-80, 119-128.
- [15] Li WJ, Park DJ, Tang SK, et al. Nocardiosis salina sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from saline soil in China[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(5): 1805-1809.
- [16] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA[J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82-84.
- [17] Swofford DL. PAPA*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4[M]. Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates, 1998-2001.
- [18] 李文英, 庄文颖. 座囊菌目及相关类群属间关系的系统学初探[J]. 菌物学报, 2009, 28(2): 161-170.
- [19] Lango Z, Toth LG, Kovacs L, et al. Identification and biochemical characterization of Streptomyces galbus from the sediment of the High-Mountain Lake La Caldera (Sierra Nevada, Spain)[J]. Folia Microbiologica, 1999, 44 (6): 651-656.