

蒋春洁,李从发,阳辉蓉,等.海南粗榧内生真菌抗肿瘤活性菌株筛选[J].江苏农业科学,2015,43(2):329-331.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.107

海南粗榧内生真菌抗肿瘤活性菌株筛选

蒋春洁,李从发,阳辉蓉,齐静,吴廷春,胡晓芊,李武,刘四新

(海南大学食品学院,海南海口 570228)

摘要:利用镰刀菌筛选模型和肿瘤细胞筛选模型对 190 株分离自海南粗榧(*Cephalotaxus hainanensis* L.)的内生真菌进行了抗肿瘤活性筛选。结果显示,16 株内生真菌的乙酸乙酯提取物对人慢性髓原白血病细胞 K562、急性早幼粒白血病细胞 NB4、人肝癌细胞 HepG-2 抑制率大于 50%,具有细胞毒活性,其中菌株 JFL3007a 和 BWL6045 的乙酸乙酯提取物对人慢性髓原白血病细胞 K562、急性早幼粒白血病细胞 NB4、人肝癌细胞 HepG-2 均有较好的抑制作用。为进一步寻找其生物活性成分奠定了基础。

关键词:海南粗榧;内生真菌;镰刀菌;抗肿瘤活性

中图分类号: Q948.12⁺2.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0329-03

海南粗榧(*Cephalotaxus hainanensis* L.),为三尖杉科(*Cephalotaxaceae*)三尖杉属(*Cephalotaxus*)植物,别名红壳松、薄叶菴子杉,属多年生高大常绿乔木,为国家二级重点保护植物。海南粗榧树皮中含有 5 种在临床上对急性非淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病等有显著疗效的酯碱:三尖杉碱(cephalotaxine)、三尖杉酯碱(harringtonine, HT)、高三尖杉酯碱(homoharringtonine, HHT)、异三尖杉酯碱(isoharringtonine)、去氧三尖杉酯碱(deoxyharringtonine)^[1]。海南粗榧中这 5 种生物碱的含量是三尖杉属植物中含量最高的,被认为是非常具有潜力的天然抗癌药源^[2]。

植物内生菌(endophyte)是指一类在其部分或全部生活中存活于健康植物组织内部,而不使宿主植物表现出明显感染症状的微生物。因其长期生活在植物体细胞间隙这样一个特殊环境中,并与寄主协同进化,形成稳定的生态关系,可能具备产生与宿主植物相同或相似的生物活性成分的能力。1993 年 Strierle 等首次从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)的树皮中分离出能产生具有抗肿瘤活性紫杉醇(Taxol)的内生真菌,这为人类解决药用植物生长缓慢,由于大量采伐引起资源紧缺和生态破坏等问题提供了新思路^[3]。

近几年来,从海南粗榧内生真菌次生代谢产物中分离到乙酰基细胞松弛素 D、细胞松弛素 D、环二肽、对羟基苯乙醇等抗肿瘤抗菌活性产物,以及一些新的化合物,初步揭示海南粗榧内生真菌代谢产物具有多样性^[4-6]。我们从海南 3 处不同地点采集的海南粗榧树皮、枝和叶样品中,分离得到 190 株内生真菌,利用镰刀菌筛选模型和细胞模型对这些内生真菌的抗肿瘤和抗菌活性进行初步筛选,为进一步研究其活性

成分奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 内生真菌 190 株海南粗榧内生真菌,由本实验室从海南省热带植物园、海南省尖峰岭自然保护区、海南省霸王岭自然保护区的海南粗榧树皮、树枝、树叶中分离,并保存。

1.1.2 镰刀菌模型菌株与肿瘤细胞株 镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)C-4 菌株,由中国热带农业科学院热带生物技术研究所提供;人慢性髓原白血病细胞 K562,急性早幼粒白血病细胞 NB4 购于中国典型培养物保藏中心,人肝癌细胞 HepG-2 购于中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

1.1.3 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):200 g 洗净的土豆,切成小块,加水煮至可以碾碎,分别用四层纱布,八层纱布和十六层纱布依次过滤,加入 20 g 葡萄糖、20 g 琼脂,定容至 1 000 mL, pH 自然。马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB):制作步骤同 PDA 培养基,不加琼脂。K562, NB4 细胞用 RPMI1640 培养基,添加 10% 胎牛血清, HepG-2 细胞用 DMEM 高糖培养基,添加 10% 胎牛血清。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌发酵液样品的制备 将试管斜面保存的内生真菌经 PDA 培养基活化后,接种于 PDB 培养基中,26 ℃、160 r/min 培养 10 d。真空抽滤,取发酵液,5 000 r/min 离心 30 min 后取上清液,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,-20 ℃ 保存备用。

1.2.2 乙酸乙酯提取物样品的制备 将试管斜面保存的内生真菌经 PDA 培养基活化后,接种于 PDB 培养基中,26 ℃、160 r/min 培养 10 d,分离菌体,50 ℃ 减压浓缩至 20~30 mL,用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,再减压蒸干。用含 DMSO(1%)的 PBS 溶液溶解提取物,终浓度为 2 000 μg/mL,-20 ℃ 保存备用。

1.2.3 镰刀菌筛选模型^[7] 将镰刀菌接种在 PDA 培养基上,28 ℃ 培养 10 d,用无菌水洗下孢子,摇匀过滤,用 PDB 培养基稀释成浓度为 1 mL 1 × 10⁴ 个的孢子悬液。于 96 孔板

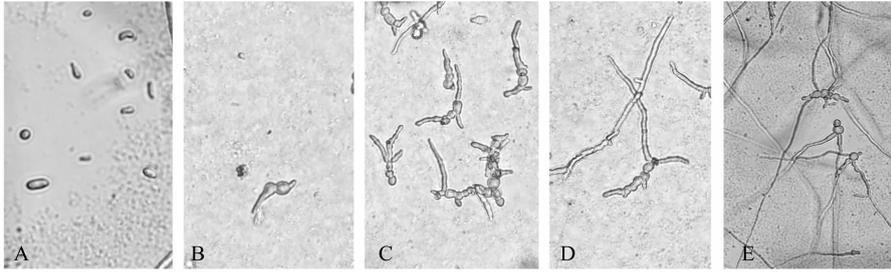
收稿日期:2014-04-04

基金项目:科技部中泰长期合作研究开发项目(编号:18-514J);博士后科学基金(编号:90279);海南省自然科学基金(编号:313034)。

作者简介:蒋春洁(1989—),女,硕士研究生,研究方向为应用微生物学。E-mail:903586099@qq.com。

通信作者:李从发,教授,博士生导师。E-mail:congfa@vip.163.com。

上每孔加入 50 μL 孢子悬液,再加入 50 μL 发酵液样品,并设置空白对照,4个复孔;继续培养 16 h 后,用倒置光学显微镜进行观察,对比空白对照,根据镰刀菌孢子或菌丝生长的形态



A—菌丝完全抑制,孢子不萌发;B—菌丝强烈抑制;C—菌丝中度抑制;D—菌丝轻度抑制;E—正常生长的菌丝

图1 镰刀菌生长状态示意图

1.2.4 最佳细胞铺板浓度的确定^[8-10] 取对数生长期的人慢性髓原白血病细胞肿瘤细胞 K562、急性早幼粒白血病细胞 NB4(直接计数),人肝癌细胞 HepG-2(用 0.25% 胰酶消化后,制成细胞悬浮液计数),接种于 96 孔培养板内,每孔细胞密度从低到高依次为: 1×10^4 、 2×10^4 、 4×10^4 、 6×10^4 、 8×10^4 、 1×10^5 个/mL,各设 6 个复孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h 后,加 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL ,继续反应 4 h,再加入 100 μL 三联液,放置过夜,使甲臞完全溶解,在 570 nm 条件下,用酶联免疫检测仪测量其 D 值。选择 D 值与细胞浓度呈线性关系,且 D 值相对较大时的细胞浓度作为最佳细胞铺板浓度。

1.2.5 肿瘤细胞筛选模型——MTT 比色法^[11] 选取对数生长期肿瘤细胞,用相应的培养基制成细胞悬浮液,用自动细胞计数仪计数,按各细胞的最佳铺板浓度接种 90 μL 于 96 孔细胞培养板,5% CO_2 ,湿度 90% 以上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。24 h 后加入样品 10 μL ,继续培养 48 h,取出置于倒置显微镜下观察细胞形态,然后加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 h 后,再向各孔加入 100 μL 三联液(10% SDS,5% 异丁醇,0.1% 浓盐酸),充分溶解,放置过夜。用酶联免疫检测仪测量各孔在 570 nm 的 D 值,按下式计算抑制率。

抑制率(IR) = $(1 - \text{待测样品 } D_{570} \text{ 值} / \text{空白对照 } D_{570} \text{ 值}) \times 100\%$ 。

1.2.6 活性菌株的形态鉴定 将试管保藏的活性菌株接种于 PDA 平板上,待生长出菌丝后插片培养,将培养后带有菌丝的插片用棉兰染液染色,在光学显微镜下观察其菌丝、孢子的形态并拍照。根据真菌菌落形态特征和显微形态特征,参照魏景超先生的《真菌鉴定手册》第二版,初步判定其种属。

2 结果与分析

2.1 最佳细胞铺板浓度的确定

培养 72 h 后,用酶联免疫检测仪测定 K562、NB4、HepG-2 细胞数量与吸光度 D 值的关系(图 2)。选择 D 值与细胞浓度呈线性关系,且 D 值在 0.8 ~ 1.2 之间的细胞浓度作为最佳细胞铺板浓度,由图 2 可知,K562、NB4、HepG-2 细胞的最佳铺板浓度分别为 4×10^4 、 6×10^4 、 6×10^4 个/mL。

2.2 海南粗榧内生真菌发酵产物的抗肿瘤活性

首先利用镰刀菌筛选模型对海南粗榧内生真菌的发酵液样品进行初筛,共获得 113 个阳性样品(活性程度至少为

异常现象,对样品的活性程度进行等级划分,分别表示为:生长抑制(\times),高度变形(+++),中度变形(++),轻度变形(+),生长正常(—)。如图 1 所示。

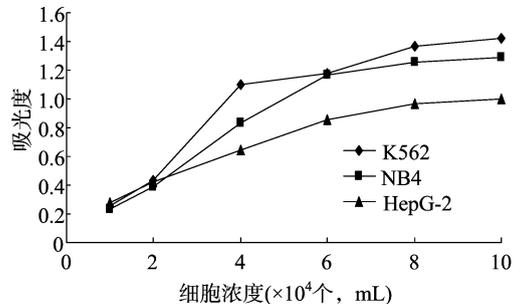


图2 吸光度与细胞数量的关系

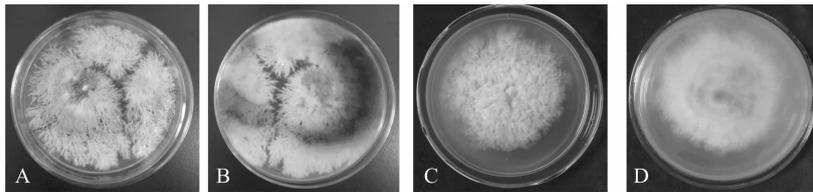
“+”)。然后对挑选出的活性较好菌株发酵液用乙酸乙酯提取,利用 MTT 比色法进一步检测阳性样品对 K562 等细胞的抑制率。发现至少对 1 株肿瘤细胞抑制率大于 50% 的阳性样品有 16 个(表 1)。其中,对 K562 细胞抑制率在 90% 以上的内生真菌有 9 株,占内生真菌总数的 4.7%。菌株 JFL3007a 和 BWL6045 的乙酸乙酯提取物对 3 种肿瘤细胞均有抑制作用,对 K562、NB4 和 HepG-2 细胞的抑制率分别达到 99.15%、88.41%、63.92% 和 88.30%、84.37%、69.35%。因此,JFL3007a 和 BWL6045 可以作为潜力菌株进行进一步研究。

表 1 海南粗榧内生真菌的抗肿瘤活性

菌株编号	抑制率(%)		
	K562	NB4	HepG-2
ZWY1021	83.18	86.53	-
ZWY1022	62.36	-	-
JFL2004	90.36	-	-
JFL2006	91.34	-	-
JFL2014	93.26	82.00	-
JFL3007a	99.15	88.41	63.92
JFL4003	76.88	-	-
BWL6007	81.54	81.35	-
BWL6026	96.63	56.11	-
BWL6045	88.30	84.37	69.35
BWL6059	90.32	-	-
BWL6075	96.10	86.91	-
BWL6078	67.80	-	-
BWL6091	96.57	88.19	-
BWL6103	79.33	-	-
BWL6127	97.71	83.88	-

2.3 活性菌株的形态鉴定

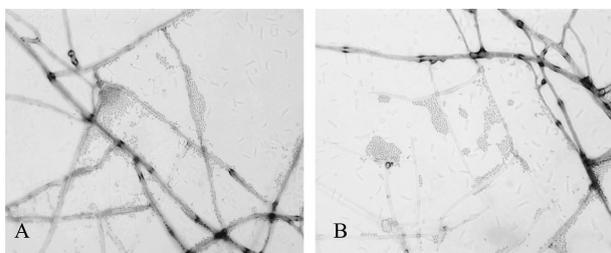
菌株 JFL3007a 和菌株 BWL6045 在 PDA 平板上, 28 °C 培养 10 d 后其菌落形态见图 3。JFL3007a 菌落蔓延生长, 平



A—JFL3007a正面; B—JFL3007a背面; C—BWL6045正面; D—BWL6045背面

图3 活性菌株 JFL3007a 和 BWL6045 的菌落形态特征

由两株菌的显微照片(图4)显示, 两者的菌丝与孢子形态均相似, 菌丝有隔, 未发现孢子囊, 分生孢子单细胞, 细小, 呈椭圆形或卵形。根据《真菌鉴定手册》^[12]初步判定其为半知菌亚门, 腔孢纲, 球壳孢目中的拟茎点霉属(*Phomopsis*)。



A—菌株 JFL3007a; B—菌株 BWL6045

图4 菌株 JFL3007a 和 BWL6045 的显微形态特征

3 讨论

稻瘟霉筛选模型是利用微管机能抑制活性原理筛选抗肿瘤药物, 因属于真核细胞, 与人体细胞具有相似的生理基础, 其微管和微管蛋白结构也相似, 是近年来筛选抗肿瘤活性物质的重要模型之一^[13-14]。鲍时翔等^[7]在筛选抗镰刀菌抗生素时发现镰刀菌 *Fusarium oxysporum* T-6 也可应用于抗肿瘤活性物质的筛选, 因此建立了镰刀菌筛选模型, 将该模型与肿瘤细胞筛选模型组合, 成功筛选到了 12 株具有较好抗肿瘤活性的海洋微生物。考虑到镰刀菌筛选模型具有实验周期短、样品处理量大、所需费用低等优点, 我们利用它对分离得到的 190 株海南粗榧内生真菌进行初筛, 再用细胞模型复筛, 筛选到 16 株具有抗肿瘤活性的内生真菌。其中对 3 株肿瘤细胞均具有较好活性的菌株 JFL3007a 和 BWL6045 经形态学鉴定, 均为拟茎点霉属。拟茎点霉属真菌是重要的植物病原菌, 主要对被子植物和裸子植物有害, 在热带、亚热带地区种类多^[15]。拟茎点霉属也是一种植物内生真菌, 在自然界的大部分植物体内广泛存在。劳佳萍^[16]以各种药用植物为研究对象, 分离鉴定出拟茎点霉属内生真菌, 并证实无论是病原拟茎点霉菌, 还是共生拟茎点霉菌都不是寄主专化性。但目前对于植物内生真菌拟茎点霉菌的次级代谢产物中是否含有与宿主植物相同或相似的活性物质, 未见报道; 在海南粗榧内生真菌的研究方面, 未见有发现拟茎点霉属的报道。因此, 对这两株菌的分子生物学鉴定与代谢产物的抗肿瘤活性需进一步研究。

坦, 正面灰白色, 背面黄褐色, 菌丝不易挑起; BWL6045 菌落蔓延生长, 菌落高度约为 2~3 mm, 正面白色, 有部分区域呈黄色, 背面也为白色, 菌丝呈棉絮状, 易挑起。

参考文献:

- [1] 梅文莉, 吴 娇, 戴好富. 三尖杉属植物化学成分与药理活性研究进展[J]. 中草药, 2006, 37(3): 452-458.
- [2] 傅立国. 三尖杉属的研究[J]. 植物分类学报, 1984, 22(4): 277-288.
- [3] 黎万奎, 胡之璧. 内生菌与天然药物[J]. 中国天然药物, 2005, 3(4): 193-199.
- [4] Chen G, Dai H F, Sha Y, et al. Two new compounds from the endophytic fungus *Colletotrichum* sp. L10 of *Cephalotaxus hainanensis* [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2011, 13(11): 1042-1046.
- [5] Dai W J, Dai H F, Wu J, et al. A new 5-acetyl-2-methylpyrrole from the endophytic fungus S20 of *Cephalotaxus hainanensis* [J]. Natural Product Communications, 2009, 4(11): 1489-1490.
- [6] Dai W J, Wu J, Han Z, et al. Metabolites from endophytic fungus S20 of *Cephalotaxus hainanensis* [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2009, 11(8): 704-709.
- [7] 鲍时翔, 林 茂, 黄惠琴, 等. 利用组合筛选模型筛选海洋微生物抗肿瘤活性物质[J]. 中国海洋药物, 2003(1): 17-20.
- [8] 侯春梅, 李新颖, 叶伟亮, 等. MTT法和CCK-8法检测悬浮细胞增殖的比较[J]. 军事医学科学院院刊, 2009, 33(4): 400, 封3.
- [9] 李红艳, 夏启胜, 徐 梅, 等. MTT、MTS、WST-1在细胞增殖检测中最佳实验条件的研究[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(11): 824-826.
- [10] 李 宁, 万文婷, 金林红. CCK-8法和MTT法检测人前列腺癌PC3细胞活性的最佳条件比较研究[J]. 贵州大学学报: 自然科学版, 2009, 26(3): 18-20.
- [11] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55-63.
- [12] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [13] Gunji S, Aritma K, Beppu T. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1983, 47: 2061-2067.
- [14] 郭 文, 蒋继志. 利用稻瘟霉模型初级筛选抗肿瘤物质研究进展[J]. 生物学通报, 2010, 45(4): 1-3.
- [15] 李雪光, 潘凤娟, 宋 洁, 等. 拟茎点霉属及其病害研究进展[J]. 大豆科技, 2012(6): 32-37.
- [16] 劳佳萍. 植物内生真菌拟茎点霉属生物多样性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.