

喜树内生真菌的分离 及其抗肿瘤活性代谢产物的筛选方法

刘吉华, 余伯阳

(中国药科大学, 江苏 南京 210038)

摘要 从喜树(*Camptotheca acuminata* Decne.)的根、枝条、叶和果实中分离纯化了48株内生真菌,通过对各个菌株的少量发酵培养,HPLC分析结合色谱峰紫外扫描检测方法,以紫外扫描图谱的相似性为依据,对喜树内生真菌产生喜树碱结构类似物进行初步筛选,并进一步以抑瘤实验确证其抗肿瘤活性。结果证明,以该方法筛选到的10个内生菌株中有7个菌株发酵液对HL-60细胞增殖具有显著的抑制活性。相对于常规的生物活性筛选,高效液相色谱结合色谱峰紫外光谱的方法,在药用植物内生真菌活性次生代谢产物筛选研究中具有快速、高效的特点。

关键词: 喜树;内生真菌;抗肿瘤活性;筛选方法

中图分类号: R284.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2004)04-0006-05

Isolation of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* and the screening method of antitumor secondary metabolite produced by the fungi LIU Ji-hua, YU Bo-yang (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2004, 13(4): 6-10

Abstract: The 48 strains of endophytic fungi were isolated from roots, branches, leaves and fruits of *Camptotheca acuminata* Decne. The secondary metabolites of these strains were screened for camptothecin and analog using the method of HPLC combined with the ultraviolet scanning spectrum according to their ultraviolet spectrums similar to camptothecins⁷ and 10 strains which could produce camptothecin analog were acquired. Their antitumor activities were screened and 7 of them could evidently inhibit the growth of HL-60 cells *in vitro*. This results show that, compared with the ordinary biological screening method, the HPLC-UV screening method is fast, convenient and more suitable for small scale preliminary screening purpose.

Key words: *Camptotheca acuminata* Decne.; endophytic fungi; antitumor activity; screening method

内生真菌是存在于健康植物中,不形成明显侵染的一类真菌,几乎所有的植物中都有内生真菌存在^[1,2]。自从1993年Stierle报道从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia* Nutt.)中分离到能产生紫杉醇的内生真菌以来^[3],人们从多种药用植物内生真菌中陆续分离到紫杉醇等抗肿瘤活性物质^[4,5],药用植物内生真菌成为人们寻找新型抗肿瘤药物的重要来源。在对药用植物内生真菌抗肿瘤活性的筛选中,通常是用TLC检测内生真菌能否产生宿主植物的活性成分^[6];或者通过大量发酵内生真菌,分离次生代谢产物,然后进行抗肿瘤活性的筛选^[7];或者对每个内生菌的发酵产物进行体外抗肿瘤筛选^[8]。这些筛选方法工作量大,筛选效率不高。

喜树(*Camptotheca acuminata* Decne.)是中国特有植物,其次生代谢产物喜树碱、羟基喜树碱类物质是拓扑异构酶I的专属性抑制剂,在临床上广泛应

用于肝癌、胃癌、膀胱癌及白血病等的治疗^[9]。喜树中喜树碱、羟基喜树碱的含量极低(0.01%~0.10%),且结构复杂难以合成^[10],远不能满足临床治疗的需要。本研究以内生菌株发酵液HPLC色谱峰紫外光谱的相似性为依据,结合体外抗肿瘤活性筛选验证,从分离的喜树内生真菌中快速有效地筛选出具有抗肿瘤活性的喜树内生真菌菌株。该方法可用于药用植物内生真菌产生宿主活性成分或其结构类似物的快速筛选,为珍稀濒危药用植物保护和天然活性成分开发利用提供科学依据。

收稿日期: 2004-04-14

基金项目: 江苏省药用植物生物技术重点实验室开放课题项目(KJS02117)

作者简介: 刘吉华(1969-),男,江苏句容人,博士,助理研究员,主要从事中药生物技术领域的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品 喜树(*Camptotheca acuminata* Decne.)根、枝条和叶为2002年11月和2003年6月多株采集的样品,其中喜树根直径约4 cm;果实2002年11月采集,多株取样。所有样品均采自江苏省·中国科学院植物研究所。

1.1.2 培养基 PDA液体和固体培养基^[5]。

1.1.3 仪器 Waters 600E型HPLC系统,配备Waters 996型二极管阵列检测器、Waters Millennium³²色谱工作站。TECAN SUNRISE酶标仪,大容量恒温振荡器、超净工作台、HERA二氧化碳细胞培养箱。

1.2 方法

1.2.1 喜树内生真菌分离 按常规无菌操作,取喜树的根、茎、叶、皮和果实,按下列程序表面消毒:自来水冲洗→75%酒精漂洗(3~5 min)→无菌水冲洗5次→0.1%升汞漂洗(10~30 s)→无菌水冲洗5次。将经过处理的样品在无菌条件下切割成小片,然后将小片种植于PDA平皿上,置28℃温箱培养3~7 d后,即可见样品切割过的边缘有菌丝长出,经纯化后转接到PDA斜面上备用^[5]。菌种于4℃冰箱保存。

1.2.2 内生真菌的摇瓶培养 将经过活化培养的内生真菌斜面菌种,产孢子的菌株以孢子接入PDA液体培养基,不产孢子的菌株以5 mL无菌水洗下斜面的菌丝,接入PDA液体培养基。于28℃,160 r·min⁻¹振荡培养6 d。

1.2.3 HPLC样品制备 取喜树内生真菌发酵培养物20 mL,用组织捣碎仪捣碎菌丝,分别以等体积氯仿萃取4次,回收氯仿至干,再用2 mL甲醇溶解,微孔滤膜过滤,即为HPLC样品。

1.2.4 HPLC条件 色谱柱 Waters SYMMETRY ODS-C₁₈色谱柱(15.0 cm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为V(甲醇):V(水)=4:6,柱温25℃,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长254 nm。

1.2.5 喜树内生真菌产生喜树碱类次生代谢产物的筛选方法 通过Waters Millennium³²色谱工作站,获得喜树内生真菌HPLC分析中每个色谱峰的紫外光谱,然后与喜树碱、羟基喜树碱的紫外光谱进行对比,具有与喜树碱、羟基喜树碱相同或相近吸收峰,

被认为该成分可能具有与喜树碱或羟基喜树碱相似的化学结构,筛选出的内生菌株将通过体外抗肿瘤实验进一步筛选。

1.2.6 抗肿瘤筛选样品的制备 取捣碎菌丝后的内生真菌发酵培养物10 mL,于4℃,5 000 r·min⁻¹离心30 min,上清液调节pH至7.20,过滤除菌即为抗肿瘤筛选样品。液体PDA培养基调节pH至7.20后过滤除菌即为对照样品。

1.2.7 抗肿瘤活性筛选方法 采用体外细胞毒测定的MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]法检测喜树内生真菌的抗肿瘤活性^[11]。将幼粒白血病细胞株HL-60细胞[RPMI 1640培养液,含10%小牛血清及青霉素和链霉素(100 U·mL⁻¹)]以1 × 10⁵细胞浓度接种于96孔培养板上,每孔接种90 μL,加入抗肿瘤筛选样品10 μL,对照组加入10 μL发酵培养基,继续培养48 h。加入5 mg·mL⁻¹ MTT溶液(溶于PBS)10 μL,37℃反应4 h,1 000 r·min⁻¹离心10 min,弃上清液,加入100 μL DMSO,酶标仪检测(测量波长570 nm,参考波长650 nm),计算相对抑制率^[5]。每组实验平行设置8孔,实验重复3次。

2 结果和分析

2.1 喜树内生真菌的分离纯化

喜树内生真菌分离纯化结果见表1。从表1可以看出,喜树内生真菌绝大多数分离自喜树的地上部分,而从喜树根中分离获得的内生真菌相对较少,只占总菌株数的10.4%。这可能是因为喜树的地上部分暴露在空气中,其内生真菌的种类和数目受环境的影响很大,而植物在其根际会释放出某些化学物质,抑制根际有害微生物的生长,因而从根中分得的内生真菌较少。

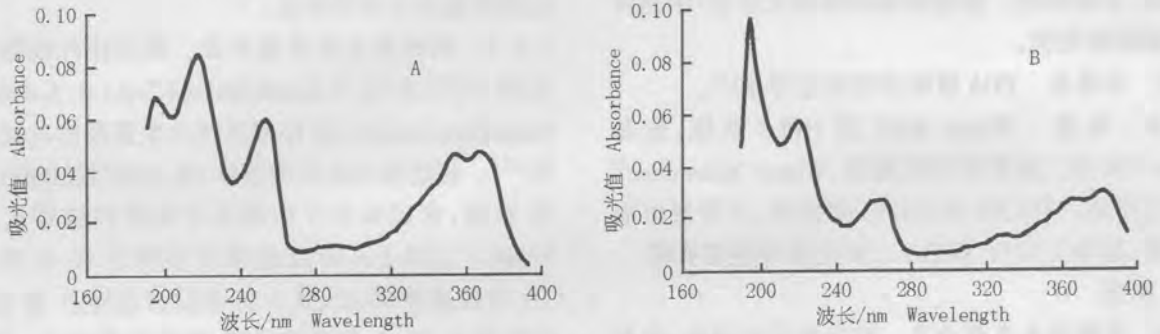
表1 喜树不同部位内生真菌的分离结果
Table 1 The isolation result of endophytic fungi from different parts of *Camptotheca acuminata* Decne.

部位 Part	内生真菌 Endophytic fungus	
	菌株数 Strain numbers	百分率/% Percentage
叶 Leaf	17	35.4
根 Root	5	10.4
枝条及皮 Branch and bark	14	29.2
果 Fruit	12	25.0

2.2 喜树内生真菌产生喜树碱类次生代谢产物的筛选

喜树碱类化合物是含六元内酯、吡啶酮、吡咯烷和喹啉的五元稠环复杂生物碱,喜树碱及羟基喜树碱类化合物的紫外光谱显示,该类化合物在 196、200、250 及 370 nm 附近有特征紫外吸收峰,以 HPLC-UV 方法对分离的 48 株喜树内生真菌产生喜

树碱、羟基喜树碱结构类似物进行筛选,发现有 10 个内生真菌菌株可能产生喜树碱结构类似物,其中来源于根的有 4 株,来源于果的 2 株,来源于小枝的 2 株,来源于叶片的 2 株。喜树碱、羟基喜树碱及喜树内生真菌产生的喜树碱结构类似物的色谱峰紫外光谱图见图 1 和图 2。



A: 喜树碱 camptothecin; B: 羟基喜树碱 hydroxycamptothecin

图 1 喜树碱和羟基喜树碱标准的 HPLC 色谱峰紫外光谱

Fig. 1 The ultraviolet spectrums of camptothecin and hydroxycamptothecin

2.3 喜树内生真菌抗肿瘤活性筛选

以 MTT 法对通过 HPLC-UV 筛选出的喜树内生真菌菌株进行体外抗肿瘤活性筛选,在筛选出的 10 个内生菌株中,有 7 个内生菌株发酵液能显著抑制白血病细胞 HL-60 的生长(图 3)。

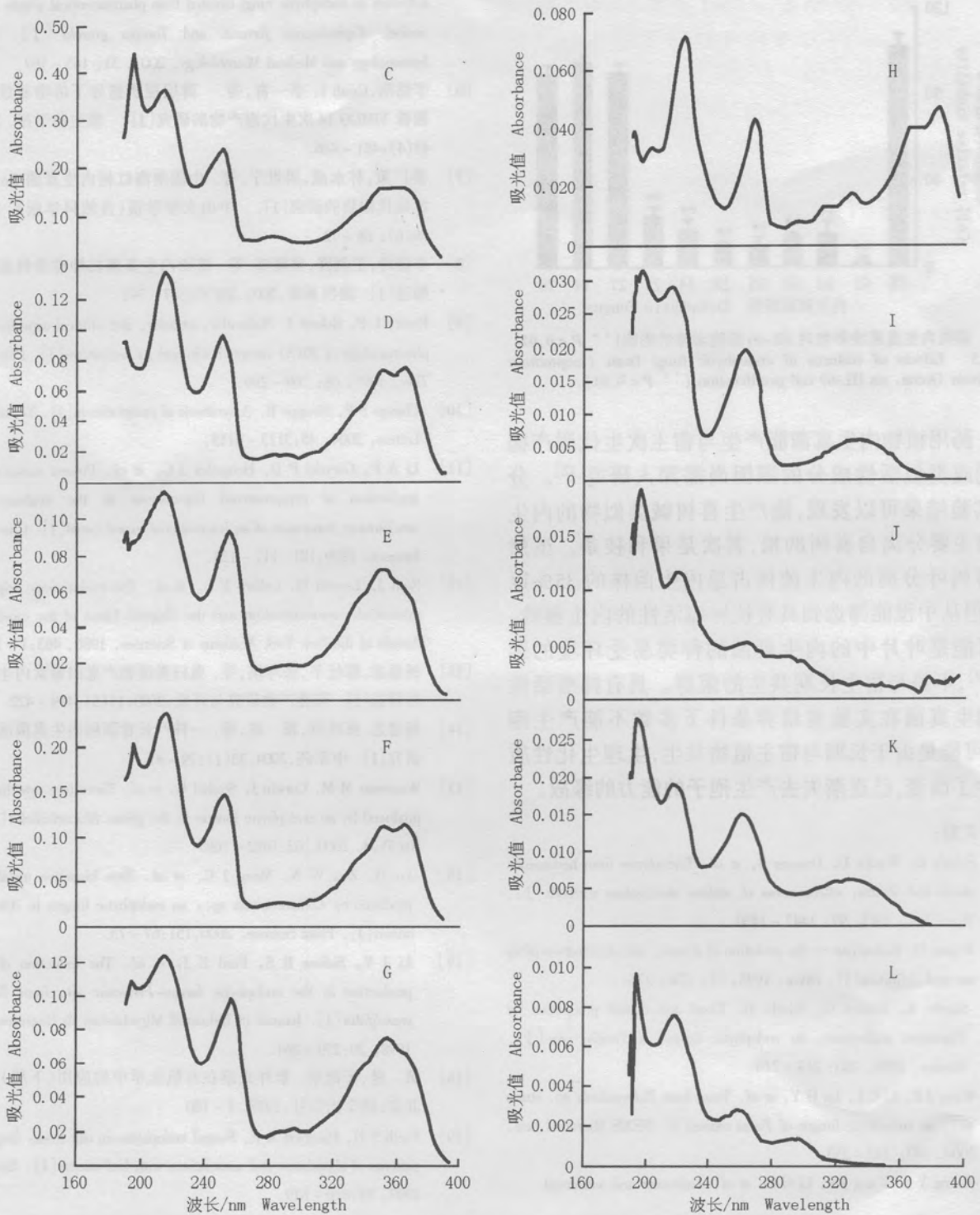
3 讨 论

近年来利用各种方法筛选出了大批疗效独特的抗肿瘤活性成分如喜树碱、紫杉醇、鬼臼毒素及美登素等,但是由于抗肿瘤活性成分在植物体内含量极低,有些植物还是珍稀濒危物种,资源蕴藏量有限,再加上植物生长缓慢,远远不能满足人们防治疾病的需求。研究表明,宿主植物与内生真菌常具有相同或相似的次生代谢产物合成途径^[12]。目前,人们已经从药用植物中分离到能够产生紫杉醇、长春新碱、鬼臼毒素等具宿主植物活性次生代谢产物的内生真菌^[1,13,14],某些内生真菌还能产生新的活性成分^[15,16]。由于内生真菌容易实现工业化培养,具有生长迅速、易控制等特点,使得药用植物的内生真菌成为人们寻找新型药物的重要来源。

目前研究药用植物内生真菌次生代谢产物常用

的方法是分离纯化出内生菌株,经过培养后以 TLC 法检测其能否产生宿主植物活性成分,或者经过大批量的发酵培养,获得一定生物量的内生真菌,再按照天然药物的研究方法,分离纯化出内生真菌中的各种次生代谢产物,然后进行生物活性的筛选。由于 TLC 检测灵敏度较低,未经过菌种选育和发酵条件优化的内生菌株的次生代谢产物含量极低^[17],因此基于 TLC 的筛选方法不能很好地检出能产生宿主活性成分的内生菌株。另外,从某种药用植物中分离的内生真菌数目通常有几十种至数百种之多,对每个菌株进行生物活性检测或者发酵分离次生代谢产物的工作量极大,筛选效率也不高。

化合物的结构类似物由于取代基团的不同,其紫外光谱的吸收峰会出现红移或蓝移,吸收峰的强度也可能有所变化,但是结构类似物的紫外光谱仍具有很大的相似性^[18],如喜树碱与羟基喜树碱、喹啉类生物碱等。以上研究表明,利用结构类似物紫外光谱的相似性,可对药用植物内生真菌产生的宿主活性成分结构类似物进行初步筛选,特别是对内生真菌产生的微量、高活性的宿主活性成分类似物进行筛选,结合体外快速药理活性筛选确证,可有效提高筛选效率。



C: 菌株 G1 culture of strain G1; D: 菌株 G2 culture of strain G2; E: 菌株 G4 culture of strain G4; F: 菌株 G5 culture of strain G5; G: 菌株 J3 culture of strain J3; H: 菌株 J4 culture of strain J4; I: 菌株 Z1 culture of strain Z1; J: 菌株 Z7 culture of strain Z7; K: 菌株 Y4 culture of strain Y4; L: 菌株 Y6 culture of strain Y6

图2 喜树内生真菌发酵液中喜树碱结构类似物的 HPLC 色谱峰紫外光谱

Fig. 2 The ultraviolet spectrums of camptothecin analog produced by the endophytic fungi isolated from *Camptotheca acuminata* Decne.

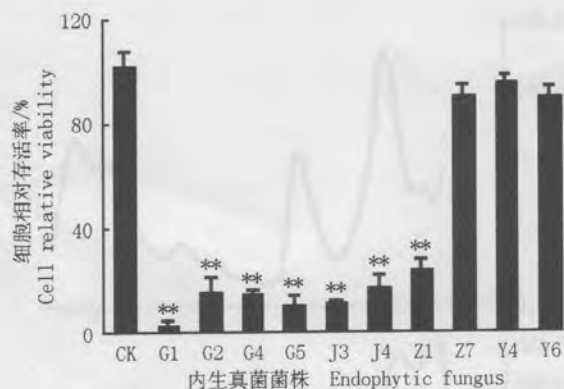


图3 喜树内生真菌培养物对 HL-60 细胞增殖的影响 (** $P < 0.01$)
Fig. 3 Effects of cultures of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* Decne. on HL-60 cell proliferation (** $P < 0.01$).

药用植物内生真菌能产生与宿主次生代谢产物相同或类似活性成分的原因尚需深入研究^[12]。分析实验结果可以发现,能产生喜树碱类似物的内生真菌主要分离自喜树的根,其次是果和枝条。虽然从喜树叶分离的内生菌株占总内生菌株的35%以上,但从中没能筛选到具有抗肿瘤活性的内生菌株,这可能是叶片中的内生真菌的种类易受环境的影响^[19],不是与宿主长期共生的菌群。具有抑瘤活性的内生真菌在实验室培养条件下多数不能产生孢子,可能是由于长期与宿主植物共生,生理生化性质发生了改变,已逐渐失去产生孢子的能力的缘故。

参考文献:

- [1] Schulz B, Wanke U, Draeger S, et al. Endophytes from herbaceous plants and shrubs, effectiveness of surface sterilization methods [J]. Mycol Res, 1993, 97: 1447-1450.
- [2] Wilson D. Endophyte — the evolution of a term, and clarification of its use and definition [J]. Oikos, 1995, 73: 274-276.
- [3] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. Science, 1993, 260: 214-216.
- [4] Wang J F, Li G L, Lu H Y, et al. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 193: 249-253.
- [5] Huang Y J, Wang J F, Li G L, et al. Antitumor and antifungal

- activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalotaxus fortunei* and *Torreya grandis* [J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2001, 31: 163-167.
- [6] 李铭刚, Groth I, 李一青, 等. 薄层层析指导下的嗜碱放线菌菌株 YIMQ 14 次生代谢产物的研究 [J]. 微生物学报, 2003, 43(4): 481-486.
- [7] 姜广策, 林永成, 周世宁, 等. 中国南海红树内生真菌 No. 1403 次级代谢物的研究 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2000, 39(6): 68-72.
- [8] 李桂玲, 王剑锋, 黄耀坚, 等. 植物内生真菌抗肿瘤活性菌株的筛选 [J]. 菌物系统, 2001, 20(3): 387-391.
- [9] Rivory L P, Robert J. Molecular, cellular, and clinical aspects of the pharmacology of 20(S) camptothecin and its derivatives [J]. Pharmacol Ther, 1995, 68: 269-296.
- [10] Chavan S P, Sivappa R. A synthesis of camptothecin [J]. Tetrahedron Letters, 2004, 45: 3113-3115.
- [11] Li A P, Gorycki P D, Hengstler J G, et al. Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel [J]. Chem Biol Interact, 1999, 121: 117-123.
- [12] Roth J, Leroith D, Collier E S, et al. The evolutionary origins of intercellular communication and the Maginot Lines of the mind [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1986, 463: 1-11.
- [13] 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 [J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(5): 419-422.
- [14] 杨显志, 张玲琪, 郭波, 等. 一株产长春新碱内生真菌的初步研究 [J]. 中草药, 2004, 35(1): 79-81.
- [15] Wagenaar M M, Corwin J, Strobel G, et al. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinochloidiella* [J]. J Nat Prod, 2000, 63: 1692-1695.
- [16] Lu H, Zou W X, Meng J C, et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua* [J]. Plant Science, 2000, 151: 67-73.
- [17] Li J Y, Sidhu R S, Ford E J, et al. The induction of taxol production in the endophytic fungus-*Periconia* sp. from *Torreya grandifolia* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1998, 20: 259-264.
- [18] 黄量, 于德泉. 紫外光谱在有机化学中的应用 (下册) [M]. 北京: 科学出版社, 1988. 1-180.
- [19] Faeth S H, Hammon K E. Fungal endophytes in oak trees: long-term patterns of abundance and associations with leaf-miners [J]. Ecology, 1997, 78: 810-819.