

雷公藤内生真菌的分离鉴定及抗肿瘤活性菌株筛选

王家明, 宋亚琼, 刘宏亮, 刘迪洲, 杨泓喆, 李乃怡, 张朝正, 孙 华

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457)

摘 要:目的:从雷公藤根(*Tripterygium wilfordii*)茎及叶中分离鉴定内生真菌,并对其发酵产物进行体外抗肿瘤活性筛选。**方法:**采用微生物纯化方法分离雷公藤植物的内生真菌,根据菌落形态和显微特征对菌株进行分类鉴定。选用 HCT-8(人结肠癌细胞)、Bel-7402(人肝癌细胞)、BGC823(人胃癌细胞)、A549(人肺癌细胞)为指标,采用 MTT 法对发酵产物进行体外抗肿瘤活性筛选。**结果:**从雷公藤不同器官中分离得到 64 株内生真菌,经形态观察鉴定为 3 目,5 科,11 属。其中 5 株内生真菌发酵产物对不同肿瘤细胞具有显著选择性细胞毒作用。**结论:**雷公藤内生真菌种类多样,具有很好的研究和应用价值。

关键词: 雷公藤;内生真菌;抗肿瘤活性;MTT 法

中图分类号: S763.15 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-7461(2011)05-0145-04

Isolation of Endophytic Fungi from *Tripterygium wilfordii* and the Screening of Its Antitumor Activities

WANG Jia-ming, SONG Ya-qiong, LIU Hong-liang, LIU Di-zhou, YANG Hong-zhe,
LI Nai-yi, ZHANG Chao-zheng, SUN Hua

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education,
College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: **Objective:** to isolate the endophyte of *Tripterygium wilfordii* and screen its antitumor activities. **Methods:** endophytic fungi were indentified by morphology. Four tumor cell lines (HCT-8, Bel-7402, BGC823, A549) were selected in the MTT assay. **Results:** sixty-four strains of endophytic fungi were isolated from the healthy root, stem and leaf of *T. wilfordii*, which belonged to eleven genera, five families, and three orders. Five of them exhibited significant cytotoxic activities toward these tumor cell lines in the MTT assay. **Conclusion:** the endophytic fungi in *T. wilfordii* were diversity and rich, showing important value of development.

Key words: *Tripterygiun wilfordii*; anti-tumor activity; endophytic fungi; MTT assay

内生真菌(endophytic fungi)是指其在生活史的某一段时间生活在植物组织内,对植物组织没有引起明显危害的真菌^[1]。植物内生真菌的次级代谢产物种类繁多、骨架新颖、生物活性多样,已成为发现新的生物活性物质的重要来源^[2-3]。近年来人们已从药用植物内生真菌中分离得到许多具有抗肿瘤活性的物质。A. Sierle^[4]等从短叶红豆杉内生真菌中分离得到抗肿瘤活性物质紫杉醇。Zhang L.

Q.^[5]等从长春花内生真菌中分离到的抗肿瘤活性物质长春新碱类似物。吴运韩^[6]等从楸树中分离得到 1 株木霉属内生真菌,其代谢产物对肝癌细胞 HepG2 具有强的体外抗肿瘤活性。张玲琪^[7]等首次报道了从云南西双版纳州美登木的茎、叶中分离筛选到 1 株内生真菌 *Chaetomium globosum* 98. M6,该真菌可产生抗肿瘤活性物质球毛壳甲素。Jiao R. H.^[8]等从植物 *Imperata cylindrica* 得到 1 株

内生真菌 *Chaetomium globosum* IFB-E019,其代谢产物 chaetoglobosins 对人鼻咽表皮肿瘤 KB 细胞具有抑制活性。M. M. Wagenaar^[9] 等从薄荷类植物 *Dicerandra frutescens* 的 1 株内生真菌发酵液中得到 3 个新化合物,这 3 个化合物对 A549 和 HCT116 2 种肿瘤细胞呈现出细胞毒活性。由此可见,从药用植物内生真菌中可以筛选获得具有抗肿瘤活性的物质。

雷公藤(*T. wilfordii*) 又名黄藤、黄藤木、黄腊藤、断肠草等,为卫矛科雷公藤属木质藤本植物,主要分布在长江中下游地区,其药用最早收载于《神农本草经》^[10]。雷公藤提取物中含有二萜类、三萜类、倍半萜类、生物碱类等多种化学成分,研究表明其具有抗肿瘤及免疫抑制等多种药理活性^[11-12]。目前,国内外对其内生真菌研究较少^[13-16]。本研究的目的在于通过对其内生真菌的分离鉴定,研究其内生真菌的分类和组成;通过体外抗肿瘤活性试验,筛选获得具有显著抗肿瘤活性的菌株,为雷公藤植物内生真菌的进一步的研究开发奠定基础。

1 材料

1.1 植物来源

无可见病斑的 4 年生雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)根、茎和叶,采自江苏省雷公藤生产基地。由南京工业大学王永禄老师代为采集并鉴定。

1.2 肿瘤细胞株

HCT-8(人结肠癌细胞)、Bel-7402(人肝癌细胞)、BGC823(人胃癌细胞)、A549(人肺癌细胞)

1.3 培养基

PDA 培养基:新鲜马铃薯去皮(200 g·L⁻¹),葡萄糖(25 g·L⁻¹),蒸馏水(1 L),固体培养基加 2%琼脂,双抗培养基加入 150 μg·mL⁻¹青霉素钾和 120 μg·mL⁻¹硫酸链霉素。

1.4 试剂与仪器

试剂:小牛血清,微孔检测板,MTT 试剂,二甲亚砜(DMSO),乙酸乙酯,甲醇,95%乙醇,次氯酸钠溶液(活性氯含量 5.2%)。

仪器:超净工作台,恒温震荡培养箱,冻干机,过滤器,CO₂ 培养箱,超速离心机,酶标仪,pH 计,微量注射器,96 孔板,硅胶 G 板。

2 方法

2.1 内生真菌的分离

用自来水将无病害雷公藤的根、茎和叶冲洗 1 h,晾干后,将叶摘下,将根和枝剪成 5 cm 长小段。在超净工作台上,按无菌操作方法进行以下工作:先用 75% 乙醇浸泡根、茎、叶材料 2 min,再用不同活

性氯浓度的次氯酸钠溶液浸泡 20 s~15 min,用无菌水漂洗 4 次,无菌纱布蘸干水分,剪去根和茎两头褐变部分,将其剪成 0.5 cm 小段,去除木质部,保留韧皮部。将韧皮部和叶剪成 0.5 cm×0.5 cm 小片。把处理过的韧皮部和叶片分别植入不同浓度马铃薯葡萄糖双抗固体培养基平板中,每皿植入 4~5 片,用封口膜将培养皿密封,置于培养箱中,28℃倒置培养,4 h 内完成内生真菌的分离工作。12 h 观察 1 次,待根、茎、叶切面处长出菌丝后,挑取其尖端部分移至新的马铃薯葡萄糖培养基平板上,28℃培养,经反复几次纯化后,即得到雷公藤内生真菌纯培养物。试验中主要采用漂洗液检验法来检测表面灭菌效果,即把最后一次漂洗材料的无菌水涂布于马铃薯葡萄糖培养基平板上,28℃培养 7 d。

2.2 分类鉴定

根据内生真菌主要的群体形态特征点(包括菌落大小、颜色、表面特征、质地)和个体形态特点(包括菌丝、子实体和孢子形态)^[17-18]。

2.3 液体发酵及产物提取

取菌丝块接种于装有 400 mL PDA 液体培养基的三角瓶中,28℃、120 r·min⁻¹摇床培养 7 d,发酵产物经 4 000 r·min⁻¹离心 15 min 后,分别获取真菌发酵液与菌丝体。发酵液采用乙酸乙酯萃取,然后减压旋转蒸干溶剂,获得浸膏。分别称取浸膏按浸膏计算,用于 MTT 测定用的样品设置为 5 个浓度(0.01、0.1、1、10、100 μg·mL⁻¹)。

2.4 MTT 法鉴定内生真菌代谢产物抗肿瘤活性

试验以 5-氟尿嘧啶作为阳性对照药,以 RP-MI1640 培养基稀释至用药浓度 20 mg·L⁻¹。采用体外细胞毒 MTT(methyl thiazolyl tetrazolium)法测定发酵液抗肿瘤活性^[19]。把培养好的人结肠癌细胞 HCT-8、人肝癌细胞 Bel-7402、人胃癌细胞 BGC823 和人肺癌细胞 A549,用完全培养基制成 1×10⁵·mL⁻¹的单细胞悬浮液接种到 96 孔培养板,每孔 100 μL。次日加入含不同浓度药物(2.3 中的 5 个浓度)及相应溶剂对照的新鲜培养基,每孔加 100 μL(DMSO 及新鲜培养基溶解样品,DMSO 终质量分数<0.5%),每组设 3 个平行孔,于 37℃继续培养。加药物 48 h 后,弃上清,每孔加入 20 μL MTT (5 g·L⁻¹,0.01 mol PBS 稀释)溶液,继续孵育 4 h,吸出细胞上清液,每孔加入 DMSO 溶液 100 μL,振荡器振荡 5 min,用酶标仪在参考波长 450 nm,检测波长 570 nm 条件下测定吸收度值,以溶剂对照处理的肿瘤细胞为对照组,计算药物对肿瘤细胞的抑制率,并按计算 IC₅₀ 值:抑制率/%=(对照组平均吸收度值-给药组平均吸收度值)/对照组

平均吸收值×100。

2.5 数据统计与分析^[20]

采用 SPSS 10.0 软件,方差分析, $P<0.05$ 为有显著性统计学意义。

3 结果与分析

3.1 内生真菌种群组成及分布

从雷公藤植物中共分离到 64 株内生真菌,经微生物学形态观察,初步鉴定为 3 目,5 科,11 属(表 1)。

表 1 雷公藤内生真菌种群组成及分布
Table 1 Endophytic fungi isolated from *T. wilfordii*

目	科	属	<i>n</i>	根	茎	叶
从梗孢目 (Moniliales)	从梗孢科 (Moniliaceae)	青霉属 (<i>Penicillium</i>)	11	5	5	1
		木霉属 (<i>Trichoderma</i>)	3	3	0	0
		头孢霉属 (<i>Oidium</i>)	2	1	1	0
		葡萄孢属 (<i>Botrytis</i>)	6	4	0	2
	暗梗孢科 (Dematiaceae)	弯孢属 (<i>Curvularia</i>)	8	3	3	2
		交链孢霉属 (<i>Alternaria</i>)	2	1	0	1
		黑孢霉属 (<i>Nigrospora</i>)	3	2	1	0
黑盘孢目 (Melanconiales)	瘤座孢科 (Tuberculariaceae)	廉孢霉属 (<i>Fusarium</i>)	10	6	3	1
	黑盘孢科 (Melanconiaceae)	刺盘孢属 (<i>Colletotrichum</i>)	6	2	4	0
无孢目 (Agonomycetales)	无孢科 (Agonomycetaceae)	丝核菌属 (<i>Rhizoctonia</i>)	10	6	4	0
		束丝菌属 (<i>Ozonium</i>)	3	2	1	0

3.2 乙酸乙酯萃取物细胞毒活性测试结果

在 64 株供测菌株中,共有 19 株内生真菌代谢产物对 4 株供测肿瘤细胞具有不同细胞毒作用,占总供测菌株的 29.69%,其中 5 个菌株具有显著细胞毒作用(表 2)。这 5 个菌株中,5#、11# 和 14# 菌株都是从根中分离得到,30# 和 41# 菌株是从嫩茎中分离得到。其中 41# 菌株针对 HCT-8 具有显著单一细胞毒作用。而 14# 和 30# 菌株分别针对肿瘤细胞 Bel-7402($0.10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和 HCT-8 ($0.16\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)体现出显著的细胞毒作用。

表 2 具显著的体外抗肿瘤作用的内生真菌(MTT)
Table 2 Cytotoxic activities of endophytic fungi isolated from *T. wilfordii*(MTT)

菌株	IC ₅₀ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
	HCT-8	Bel-7402	BGC 823	A 549
5 #	1.08	1.27	3.34	>50
11 #	3.31	4.06	>50	>50
14 #	5.46	0.10	>50	>50
30 #	0.16	>50	2.33	>50
41 #	6.05	>50	>50	>50

在分离获得的 64 株内生真菌中,青霉属最多,为 11 株,占 17.19%;其次是廉孢霉属和丝核菌属,各为 10 株,占 15.63%;弯孢属 8 株,占12.50%。这 4 属为雷公藤的内生真菌优势属,占总数的 60.94%。雷公藤内生真菌在不同部分分布也是不相同的,其中根部分布最多为 35 株,其次是茎中为 22 株,叶中最少为 7 株。这些内生真菌在植物器官中广泛分布,但寄生于根中的内生菌种类和数量较多,而茎和叶中的内生真菌种类和数目较少(表 1)。

4 结论与讨论

雷公藤植物中有效成分含量极低,同时其生长缓慢,自然资源非常缺乏。而内生真菌与宿主植物长期共同生活,可能存在基因直接传递,导致菌株代谢产物可能与宿主植物活性成分相同或相似^[21]。因此从雷公藤内生真菌中寻找到目标菌株,并从中提取单体代替植物中提取单体成分,可解决雷公藤植物药用资源严重缺乏的难题。

在本研究中,通过对雷公藤植物内生真菌的分离,共获得 64 株内生真菌,其普遍存在于植株的根、茎、叶器官中,但根中含菌株数量最高,叶中最低。这可能与根的生长年限较长有关,本研究中根的生长年限为 4 a,而所取的嫩茎仅为 1~2 a,叶仅为当年生。同时在试验中叶子的体积过薄,而在灭菌过程中可能使其中菌株也受到一定损伤,因此叶中分离得到的菌株最少,以后研究中应尝试缩短叶的灭菌时间。在所有内生真菌的分布中,根中菌株数量和种群占有一定优势,这可能与雷公藤的根为主要入药部位有关。同时本研究中的雷公藤采自 9 月份,此时雷公藤植物中生物碱含量在一年中相对

较低,而雷公藤内酯醇含量相对较高,这也可能与雷公藤内生真菌中此时的优势属有关^[22]。

64 株内生真菌萃取物对不同肿瘤细胞 HCT-8、Bel-7402、BGC823、A549 生长抑制试验结果显示,其中 19 株菌株均具有不同程度的细胞毒活性,5 株菌株具有较强的选择性细胞毒活性。上述 5 株内生真菌的抗肿瘤活性成分基础化学研究将另文报道。

参考文献:

[1] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152.
GUO L D. Advances of researches on endophytic fungi[J]. Mycosystema, 2001, 20(1): 148-152. (in Chinese)

[2] TAN R X, ZOU W X. Endophytes: a rich source of functional metabolites[J]. Nat. Prod. Rep., 2001, 18: 448-459.

[3] GARY S, BRYN D, UVIDELIO C, *et al.* Natural products from endophytic microorganisms[J]. J. Nat. Prod., 2004, 67: 257-268.

[4] SIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew[J]. Science, 1993, 260: 214-216.

[5] ZHANG L Q, GUO B, LI H Y, *et al.* Preliminary study on the isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic value[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2000, 31: 805-807.

[6] 吴运韩, 李美芽, 张田, 等. 一株楸树内生真菌的鉴定及其发酵产物抗肿瘤特性研究[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(6), 90-93.
WU Y W, LI M Y, ZHANG T, *et al.* Study on the identification of one endophytic fungus isolated from *Catalpa bungei* and the anti-cancer activity of metabolites produced by the fungus[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(6), 90-93. (in Chinese)

[7] 张玲琪, 王海昆, 邵华, 等. 美登木内生真菌产抗癌物质球毛壳甲素的分离及鉴定[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(3): 172-175.
ZHANG L Q, WANG H K, SNAO H, *et al.* Isolation and determination of the anti-cancer substance of chaetogolobosin A producing by endophytic fungus of in *Maytenus hookeri*[J]. Chinese Pharm. J., 2002, 37(3): 172-175. (in Chinese)

[8] JIAO R H, XU S, TAN R X, *et al.* Chaetominine, a cytotoxic alkaloid produced by endophytic *Chaetomium* sp. IFB-E015 [J]. Org. Lett, 2006, 8: 5709-5712.

[9] WAGENAAR M M, CLARDY J D. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an endangered mint [J]. J. Nat. Prod., 2001, 64: 1006-1009.

[10] 李家实. 中药鉴定学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000: 132.

[11] 刘明星, 董静, 杨亚江, 等. 雷公藤甲素的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(3): 170-174.
LIU M X, DONG J, YANG Y J, *et al.* Progress in research on triptolide[J]. China Journal of Chinese Materia Medica [J]. 2005, 30(3): 170-174. (in Chinese)

[12] BRINKER A M, MA J, LIPSKY P E, *et al.* Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* (Celastraceae)[J]. Phytochemistry, 2007, 68: 732-766.

[13] 宋萍, 洪伟, 吴承帧, 等. 雷公藤内生真菌的分离及抗肿瘤活性研究[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2009, 10(4): 310-313.
SONG P, HONG W, WU C Z, *et al.* Isolation and anti-tumor activities of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii* Hook[J]. Journal of Beihua University: Natural Science, 2009, 10(4): 310-313. (in Chinese)

[14] 宋萍, 洪伟, 吴承帧, 等. 雷公藤内生真菌的抑菌活性研究[J]. 中国农业通报, 2010, 26(5): 262-266.
SONG P, HONG W, WU C Z, *et al.* Antibacterial and antifungal activity of endophytic fungi from *Tripterygium* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(5): 262-266. (in Chinese)

[15] 申屠旭萍, 陈育峰, 俞晓平. 雷公藤内生真菌的分离及活性菌株的筛选[J]. 浙江农业学报, 2006, 18(5): 308-312.
SHENTU X P, CHEN X F, YU X P, *et al.* The isolation of endophytic fungi from of its active strain[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2006, 18(5): 308-312. (in Chinese)

[16] WAGENAAR M M, CORWIN J, STROBEL G, *et al.* Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinochadiella* [J]. J. Nat. Prod., 2000, 63: 1692-1695.

[17] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982.

[18] 巴尼特 H L, 亨特 B B. 半知菌属图解[M]. 沈崇尧, 译. 北京: 科学出版社, 1977.

[19] 陆勇芹, 周文明, 王琦, 等. 木蹄层孔菌化学成分及不同提取物体外抗肿瘤活性研究[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(4): 131-134.
LU Y Q, ZHOU W M, WANG Q, *et al.* A preliminary study on the chemical composition and anticancer effects of fomes *Fomentarius in vitro*[J]. Journal of Northwest Forestry Universit, 2007, 22(4): 131-134. (in Chinese)

[20] 李洪燕, 李燕, 刘忠海, 等. 重组人内抑素的抗肿瘤活性[J]. 药学报, 2002, 37(10): 763-766.
LI H Y, LI Y, LIU Z H, *et al.* Studies on antitumor activity of rhendostatin [J]. Acta Phamaceutica Sinica, 2002, 37(10): 763-766. (in Chinese)

[21] ZHANG H W, SONG Y C, TAN R X. Biology and chemistry of endophytes[J]. Nat. Prod. Rep., 2006, 23: 753-771.

[22] 陈俊元, 夏志林, 徐裕青. 闽产雷公藤不同采收期有效成分含量的比较[J]. 福建药学杂志, 1990, 6(1): 32-33.