

叶底珠内生真菌提取物的抗炎镇痛和抗氧化活性研究

曹森¹, 王婷¹, 高天¹, 王华¹, 李俊南¹, 朱倩倩¹, 杜文^{1, 2*}, 孙春龙^{1, 2}, 李学平^{1, 2}

1. 滨州学院 生物与环境工程学院, 山东 滨州 256600

2. 滨州学院 山东省黄河三角洲脆弱生态带工程技术研究中心, 山东 滨州 256600

摘要: 目的 研究黄河三角洲贝壳堤岛叶底珠内生真菌代谢产物醋酸乙酯粗提物的体外抗炎镇痛和抗氧化活性, 筛选鉴定具有活性的内生真菌。方法 以黄河三角洲贝壳堤岛叶底珠为实验材料分离内生真菌, 通过1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法、二甲苯致小鼠耳廓肿胀法以及醋酸扭体法测定其代谢产物醋酸乙酯粗提物的抗氧化活性、抗炎作用以及镇痛作用。通过雷氏盐剩余比色法、Folin-Ciocalteu法、亚硝酸钠-硝酸铝比色法检测活性菌株的总生物碱、总酚、总黄酮的含量, SPSS 16.0软件分析3种生物活性与3种成分含有量的相关性。基于核糖体RNA基因(即rDNA)内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS)的多态性的序列分析, 通过分子生物学方法对筛选出的活性菌株进行鉴定。结果 共分离得到内生真菌59株, 其中8株表现出不同的抗氧化活性, 10株对小鼠耳肿胀有不同程度的抑制作用, 8株对醋酸诱导的疼痛有不同程度的抑制作用; 总酚含量和抗氧化作用、总生物碱含量和抗炎活性间具有显著相关性; 初步鉴定生物活性较高的8株内生真菌菌株为 *Chaetomium globosum*、*Chaetomium* sp.、*Fusarium* sp.、*Fusarium solani*、*Cladosporium ramotenellum*、*Leptosphaeria* sp.、*Phoma multirostrata* 和 *Phoma* sp.。结论 黄河三角洲贝壳堤岛叶底珠内生真菌具有良好的体外抗炎镇痛和抗氧化活性, 总酚和生物碱含量是影响生物活性的主要因素。

关键词: 叶底珠; 内生真菌; 内转录间隔区(ITS); 抗氧化; 抗炎镇痛; 总酚; 总生物碱

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)06-1232-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.06.014

Study on anti-inflammatory, analgesic and antioxidative activities of extracts from *Securinega suffruticosa*

CAO Sen¹, WANG Ting¹, GAO Tian¹, WANG Hua¹, LI Junnan¹, ZHU Qianqian¹, DU Wen^{1, 2}, SUN Chunlong^{1, 2}, LI Xueping^{1, 2}

1. School of Biological and Environmental Engineering, Binzhou University, Binzhou 256600, China

2. Shandong Engineering and Technology Research Center for Fragile Ecological Belt of Yellow River Delta, Binzhou University, Binzhou 256600, China

Abstract: Objective In order to study the *in vitro* anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activity of crude extracts of endophytic fungi metabolites of the *Securinega suffruticosa* (Pall.) Rehd from seashell islands of Yellow River Delta, and to screen and identify bioactive endophytic fungi. **Methods** The endophytic fungi were isolated by using the *S. suffruticosa* from seashell islands of Yellow River Delta. The antioxidant activity, anti-inflammatory activity and analgesic activity of the crude metabolite extracts were determined by DPPH, xylene-induced mouse ear swelling method and acetic acid writhing test. The active components of the active strain were detected. SPSS16.0 software was used to analyze the correlation between the three biological activities and the content of the three components. The selected active strains were identified by molecular biology methods. **Results** A total of 59 endophytic fungi strains were isolated. Among them, eight strains showed different antioxidant activities, ten strains showed different inhibitory effects on ear swelling of mice and eight strains showed different inhibitory effects on pain induced by acetic acid. There was significant correlation between total phenol content and antioxidant activity, total alkaloid content and anti-

收稿日期: 2020-10-26

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(201910449012、201710449009); 山东省自然科学基金项目(ZR2016CL01、ZR2016BL16); 滨州学院博士基金(2016Y02、2016Y17)

第一作者: 曹森(1998—), 男, 在读本科生, 研究方向为中药学。Tel: (0543)3190096 E-mail: 877822683@qq.com。

*通信作者: 杜文, 副教授, 博士, 主要从事药用真菌的研究。Tel: (0543)3190096 E-mail: duwen6688@163.com

inflammatory activity. Eight endophytic fungal strains with high bioactivity were identified as *Chaetomium globosum*, *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp., *Fusarium solani*, *Cladosporium ramotenellum*, *Leptosphaeria* sp., *Phoma multirostrata*, and *Phoma* sp..

Conclusion The endophytic fungi of the *S. suffruticosa* from seashell islands of Yellow River Delta have good anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities in vitro. The total phenol content and alkaloid content are the main factors that affect the biological activity.

Key words: *Securinega suffruticosa*; endophytic fungi; ITS; antioxidant activity; anti-inflammatory and analgesic effects; total phenol; total alkaloids

叶底珠 *Securinega suffruticosa* 是属于大戟科的落叶灌木,一般高1~2 m,丛生、细枝、树形扩展,通常根部入药,是中国传统中药材之一^[1-2]。叶底珠主要含有以一叶萩碱(securinine)为代表的一叶萩型生物碱(securinega-type alkaloids)类化合物,还含有黄酮、芦丁、鞣质、酚类化合物及多种氨基酸等有效化学成分^[3]。药理研究发现,叶底珠具有活血舒筋、健脾益肾、祛风活血等功效,对神经衰弱、面部神经麻痹、小儿麻痹后遗症、眩晕、耳聋、神经衰弱、嗜睡症、阳痿、急性肝损伤等疾病也有一定的疗效^[4-5]。黄河三角洲贝壳堤岛是世界上规模最大、唯一新老并存的贝壳堤,主要由生活在潮间带的贝类死亡之后的壳体及其碎屑,经波浪搬运在高潮线附近堆积形成。叶底珠是黄河三角洲贝壳堤岛滩脊地带的常见灌木树种之一。除了关注植物本身之外,发现黄河三角洲贝壳堤土壤里放线菌中链霉菌属(42%)和拟诺卡氏菌(11%)为优势菌属,有94株至少对1种指示菌有抑菌作用^[6],表明黄河三角洲贝壳堤存在丰富的放线菌资源,有很多潜在的新菌种和活性菌株。

植物内生真菌是指在植物体内定植,但不引起植物明显病害的一类真菌^[7]。内生真菌与宿主植物具有非常复杂的关系。一些内生真菌可以产生促进植物生长的激素,也能够产生拒食素帮助宿主抵御生物取食,还能够产生药用成分以及众多具有生物活性的产物等^[8]。从内生真菌中提取具有抗菌活性的天然产物不仅可以突破植物资源的匮乏、再生周期长度的限制,而且利用工业发酵可以实现天然活性化合物的批量生产,成本低且无污染^[9]。目前,许多学者已经发现了内生真菌代谢产物的新结构和抗菌活性。例如,从红树林中分离到1个新的4-羟基-2-吡啶酮家族,内生真菌弯曲菌属 *Campylocarpon* sp. HDN13-307^[10]。长春花碱是1种单萜吲哚生物碱,从夹竹桃内生真菌 *Geomyces* sp. CH1 中分离得到,该生物碱对乙酰胆碱酯酶活性有明显抑制作用^[11]。内生真菌广泛分布于许多植物物种中,许多菌株可以生产多种活性天然产物^[7]。

据统计,新发现的真菌天然产物中,约有一半来自内生真菌,包括大量具有生物活性的天然化合物^[12]。

目前有关叶底珠内生真菌的研究,主要集中在内生真菌的分离鉴定以及其抑菌活性的研究^[1-2],尚未见有关内生真菌在抗氧化以及抗炎镇痛方面的报道。本课题组采集特殊的生态环境-黄河三角洲贝壳堤的叶底珠,分离其中的内生真菌,筛选出具有抗氧化、抗炎镇痛作用的活性菌株,为开发黄河三角洲具有生物活性的内生真菌提供参考。

1 材料

1.1 植物、药物及主要试剂

在黄河三角洲贝壳堤岛选取3~6年的健康叶底珠,经滨州大学孙景宽教授鉴定为大戟科叶底珠 *Securinega suffruticosa* (Pall.) Rehd.

维生素C(Vc,天津百伦斯生物技术有限公司,批号50-81-7,规格100 mg);阿司匹林肠溶片(大同市利群药业有限责任公司,批号H14022744,规格50 mg/片);盐酸水苏碱(江苏永健医药科技有限公司,批号161037-160825,规格20 mg/瓶);没食子酸(合肥博美生物科技有限责任公司,规格20 mg/瓶,标准级);芦丁(合肥博美生物科技有限责任公司,规格20 mg/瓶,标准级);二甲苯(批号20150506)、冰醋酸(批号20140529),均购自国药集团化学试剂有限公司。真菌基因组DNA提取试剂盒、2×Pfu PCR buffer,购自成都兰博生物科技有限公司。内转录间隔区(ITS)引物合成及测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。其他试剂使用分析纯。

1.2 动物

清洁级ICR昆明小鼠200只,体质量(30±2) g,雌雄各半,由山东绿都生物科技有限公司提供,实验动物生产许可证号为SYXK(鲁)20160008。在温度(25±2)℃,10 h光照下条件下正常饲养3 d后开始实验。

2 方法

2.1 内生真菌的分离纯化

采取新鲜健康无病症的叶底珠完整植株,用自来水冲洗干净,置于滤纸上自然风干。分别将叶底

珠的根、茎、叶等切成约0.5 cm的小段,置于干净的培养皿中。按下列程序进行表面消毒^[13]:75%乙醇漂(浸)洗3 min,无菌水冲洗5次,0.1%升汞消毒3 min,无菌水冲洗5次,用灭菌滤纸吸干多余水分,无菌刀片将叶底珠切成0.2 cm×0.2 cm的小块段。将上述组织块分别置于加青霉素的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基中,每皿3块,25℃恒温培养,同时将上述经表面消毒的材料不做任何处理,直接种植于PDA培养基中,25℃培养,检查表面消毒是否彻底。培养3~10 d后及时采用尖端菌丝挑取法,挑取形态不同的菌丝或菌落移种到新鲜PDA培养基上进行纯化,从野生叶底珠的根、茎和叶中分别分离得到28、19、12株内生真菌菌株,纯化后转接到斜面上保存备用。

2.2 内生真菌代谢产物粗提物的制备

于250 mL的三角瓶中加入80 mL PDA培养液,将内生真菌接种在PDA培养液中,摇床(28℃、180 r/min)振荡培养6~7 d。待真菌发酵成熟,滤去菌丝体,滤液用醋酸乙酯萃取3次,合并、浓缩和蒸干后称质量,提取率约为26%,即为醋酸乙酯粗提液供试样品(共59种)。

2.3 生物活性实验

2.3.1 DPPH·清除活性^[14] DPPH以甲醇溶解,质量浓度为0.4 g/L,向200 μL DPPH溶液中加入质量浓度为0.1 g/L的供试样品100 μL,37℃放置30 min,测定517 nm处的吸光度(A)值。对照以甲醇代替样品,以Vc作为阳性对照。DPPH·清除率按公式计算。

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率} = (A_{\text{甲醇}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{甲醇}}$$

2.3.2 小鼠耳肿法^[15] 选取健康昆明种小鼠,雌雄各半,按体质量和性别随机分组。对照组ig纯净水10 mL/kg,阳性对照组ig 0.5 g/kg的阿司匹林^[16],供试样品按0.5 g/kg剂量ig给药,每天1次,连续5 d,末次给药1 h后,用二甲苯0.05 mL均匀涂布于各小鼠右耳的正反面,30 min后脱颈椎处死,用直径8 mm打孔器在两耳同一部位扎下左右耳片,精密称质量,以右耳的质量减去左耳的质量作为耳廓炎性肿胀度,计算右耳肿胀度及抑制率。

耳肿胀度抑制率=(模型组肿胀度-给药组肿胀度)/模型组肿胀度

2.3.3 醋酸致小鼠扭体试验^[15] 选择健康昆明种小鼠,分组及给药同“2.3.2”项。末次给药后1 h,各鼠均ip 0.6%醋酸0.2 mL/只。记录各组小鼠ip醋酸后15 min内的扭体(伸缩后肢、爬行、臀部抬高、腹

部收缩内凹)的次数,并计算抑制率。

扭体抑制率=(模型组平均扭体次数-给药组平均扭体次数)/模型组平均扭体次数

2.4 化学成分指标测定

总生物碱含量测定:取样品粉末适量加90%乙醇回流提取2 h,滤液经旋转蒸发仪浓缩,用0.1 mol/L盐酸蒸馏水定容至10 mL,以盐酸水苏碱为对照品,采用雷氏盐剩余比色法^[17]测定;**总酚含量测定:**取样品粉末适量,加蒸馏水回流提取2 h,滤液经旋转蒸发仪浓缩,用蒸馏水定容至10 mL,以没食子酸为对照品,采用Folin-Ciocalteu法^[18]测定;**总黄酮含量测定:**取样品粉末适量,按料液比1:25加入50%乙醇,60℃超声提取40 min,滤过,加50%乙醇定容至10 mL,以芦丁为对照品,采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法^[18]测定。

2.5 内生真菌分子生物学鉴定

取内生真菌发酵后离心,取菌丝冷冻干燥。取100 mg菌丝于2 mL EP管内按照DNA提取试剂盒说明书的步骤采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取内生真菌DNA。按照25 μL体系,加入12.5 μL 2×Pfu PCR Mix,0.5 μL ITS1,0.5 μL ITS4,1.5 μL DNA,10 μL超纯水。以ITS为引物进行PCR反应,扩增ITS1-5.8S rDNA-ITS2序列。对PCR反应产物利用1%的凝胶于120 V电泳30 min,根据Marker判断是否存在400~800 bp大小片段。对于成功扩增目的片段的样品送交生工生物工程(上海)股份有限公司进行电泳切胶纯化测序。根据测序结果,在GenBank数据库中进行BLAST比对,搜索同源序列。尽量选取有代表性菌株序列作进一步的分析。利用软件进行系统发育分析,构建邻接树^[2]。将所有ITS序列提交至GenBank数据库,登录号为G13-MG548560、G1-MG548557、Y17-MG548570、D1-MG548565、Z1-MH383207、A1-MG548577、A3-MH383192、Y2-MH383177。

2.6 统计学分析

实验所得数据用SPSS 16.0统计软件分析,结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用ANOVA(one-way analysis of variance)单因素方差分析,组间比较采用LSD法。

在前期内生真菌生物活性检测的基础上,选用8个菌株间差别较明显的下列6个特征:总生物碱含量(μg/g)、总黄酮含量(mg/g)、总酚含量(mg/g),DPPH·清除率(%),耳肿胀度抑制率(%),扭体抑制率(%)作进一步分析。用SPSS 16.0统计软件对所

选数据,建立相似性矩阵,选用相关系数进行聚类分析。

3 结果

3.1 叶底珠内生真菌的分离与培养

采用组织块法从野生叶底珠的根、茎和叶中共分离得到28、19、12株内生真菌菌株,分离率分别为65.12%、47.50%、27.91%,平均分离率为46.83%。可见叶底珠根部内生真菌的数量明显多于叶部,表明内生真菌的分布具有组织偏好性。此外,空白对照培养基上未长出菌落,说明无环境污染;并且接触表面消毒材料的培养基上也无菌落长出,说明消毒完全,所得菌株为来自植物体内真菌。在PDA培养基上培养7 d后,观察各内生真菌的菌落形态和显微结构,叶底珠的内生真菌在生长速度、菌落形态和显微结构上存在较多差异,具有较为丰富的形态多样性。

3.2 抗氧化实验结果

通过DPPH·法对59株内生真菌发酵产物的抗氧化活性进行筛选,只有8株表现出不同的抗氧化活性。菌株Y2、G1和D1代谢产物醋酸乙酯提取物对DPPH·自由基均有较强的清除活性,其中Y2和G1的活性最强,对DPPH·的清除率分别为(69.83±0.78)%、(66.72±0.66)%。见表1。

表1 叶底珠内生真菌的抗氧化活性测试

Table 1 Antioxidant activity tests of endophytic fungi in *S. suffruticosa*

菌株样品	分离部位	DPPH·清除率/%
对照	—	—
V _c	—	75.12±0.48
G1	根	66.72±0.66
G13	茎	53.23±0.74
Y17	根	39.60±0.82
Y2	根	69.83±0.78
D1	叶	62.88±1.43
Z1	根	44.25±0.65
E1	茎	26.43±2.13
E17	叶	6.96±0.84

3.3 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

二甲苯能明显诱导小鼠耳肿胀,在所测试的59株菌株中,有10株对小鼠耳肿胀有不同程度的抑制作用。结果如表2所示,阿司匹林片0.5 g/kg和菌株A1、G1、Y2、D1、G13、Z1代谢产物醋酸乙酯提取物对二甲苯诱导的小鼠耳肿胀有显著的抑制作用($P <$

表2 叶底珠内生真菌的抗炎活性测试

Table 2 Anti-inflammatory activity tests of endophytic fungi in *S. suffruticosa*

组别	分离部位	耳肿胀度/mg	抑制率/%
模型	—	20.77±1.76	—
阿司匹林	—	11.12±2.48**	46.46
A1	茎	16.34±1.66*	21.33
G1	根	11.22±2.53**	46.00
K2	根	18.62±2.49	10.35
Y2	根	13.42±1.78*	35.39
G5	根	19.32±2.56	15.65
D1	叶	14.52±1.47**	41.45
W1	根	20.07±1.76	3.37
G13	茎	15.32±2.52*	26.24
E1	茎	19.13±1.53	7.90
Z1	根	15.12±2.01*	27.20

与模型组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

0.05、0.01),菌株G1和D1的作用强度最显著,接近阳性对照药。

3.4 对醋酸致小鼠扭体反应的影响

醋酸能明显诱导小鼠疼痛,在所测试的59株菌株中,有8株对醋酸诱导的疼痛有不同程度的抑制作用。结果如表3所示,阿司匹林片0.5 g/kg和菌株A3、Y2、G13、A1、G1、D1代谢产物醋酸乙酯提取物对醋酸诱导的小鼠扭体反应有显著抑制作用($P < 0.05、0.01$)。菌株G1作用最强,接近阳性对照药。

3.5 生物活性内生真菌的化学成分含量的测定

选择生物活性较高的8株内生真菌菌株G1、

表3 叶底珠内生真菌对小鼠扭体反应的抑制作用

Table 3 Effect of endophytic fungi in *S. suffruticosa* on writhing body response induced by acetic acid in mice

组别	分离部位	扭体次数	抑制率/%
模型	—	26.37±2.74	—
阿司匹林	—	11.42±2.62**	56.70
G13	茎	17.34±1.36*	34.24
G1	根	11.22±2.53**	57.45
A3	茎	18.62±2.49*	29.39
Y2	根	14.42±1.60*	35.39
L1	叶	20.52±2.52	22.18
D1	叶	13.34±2.37**	49.41
W1	根	22.07±1.54	16.31
A1	茎	19.32±2.31*	26.73

与模型组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

G13、Y17、Y2、D1、Z1、A3 和 A1 的代谢产物醋酸乙酯提取物进行检测。所测试菌株的结果见表 4, 内生真菌菌株 Y2 代谢产物提取物的总黄酮与总酚含量最高, 达到 1.46、1.91 mg/g; G1 代谢产物提取物总生物碱含量最高, 达到 112.93 μg/g。活性实验发现, 内生真菌菌株 Y2 提取物的抗氧化效果最好, 推测菌株 Y2 能有效富集抗氧化成分, 它的提取物中总黄酮和总酚含量最高, 说明这二者的含量可能与抗氧化活性有关。其中抗炎效果最好的内生真菌菌株 G1 的提取物, 其生物碱含量显著高于其他真菌的提取物, 推测生物碱可能是内生真菌代谢产物提取物发挥抗炎作用的有效物质成分。

相关性分析见表 5, 总生物碱含量和抗炎活性、

表 4 叶底珠内生真菌提取物的含量测定
Table 4 Determination of extract of endophytic fungi from *S. suffruticosa*

组别	总生物碱/(μg·g ⁻¹)	总黄酮/(mg·g ⁻¹)	总酚/(mg·g ⁻¹)
G13	59.52±2.37	0.96±0.37	1.50±0.12
G1	112.93±3.60	1.37±0.14	1.66±0.10
Y17	13.87±1.50	1.15±0.13	1.04±0.25
Y2	87.67±3.41	1.46±0.12	1.91±0.19
D1	107.66±4.25	1.05±0.10	1.22±0.11
Z1	63.54±1.16	0.34±0.12	0.94±0.11
A3	17.87±2.11	0.25±0.24	0.33±0.02
A1	59.65±3.81	0.67±0.08	0.23±0.08

表 5 相关性分析结果

Table 5 Correlation analysis results

相关因子	总生物碱含量	总黄酮含量	总酚含量	抗氧化	抗炎	镇痛
总生物碱含量	1	0.527	0.596	0.687	0.989*	0.726
总黄酮含量	0.527	1	0.810	0.748	0.512	0.458
总酚含量	0.596	0.810	1	0.952*	0.637	0.389
抗氧化	0.687	0.748	0.952*	1	0.719	0.358
抗炎	0.989*	0.512	0.637	0.719	1	0.668
镇痛	0.726	0.458	0.389	0.358	0.668	1

*表示在 0.05 水平上显著相关

* indicates a significant correlation at 0.05 level

multirostrata (KJ767077.1 和 MG238549.1) 位于同一分支, 其聚类支持强度为 97%; A1 与多株 *Phoma* sp. 位于同一分支, 其聚类支持强度为 99%。初步鉴定 8 株菌株为 *Chaetomium globosum* G1、*Chaetomium* sp. G13、*Fusarium* sp. Y2、*Fusarium solani* Y17、*Cladosporium ramotenellum* D1、*Leptosphaeria* sp.

总酚含量和抗氧化活性间达到了显著相关 ($P < 0.05$)。同时, 3 种活性物质含量与镇痛活性的相关系数为 0.726~0.389, 总黄酮含量与抗氧化活性的相关系数为 0.748。由此可见提取物的抗氧化活性主要来自总酚, 提取物的抗炎活性主要来自总生物碱。

3.6 生物活性内生真菌的鉴定

选取具有显著生物活性的 8 株内生真菌菌株进行鉴定, 对内生真菌进行 DNA 提取和 PCR 扩增, 产物进行电泳检测。目的条带进行纯化并测序, 将所有序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对。

基于 rDNA-ITS 序列分析, 比较了 8 株内生真菌菌株 G1、G13、Y17、Y2、D1、Z1、A3 和 A1 的序列并将它们与最近的菌种用邻接法 (NJ) 进行了比较 (图 1)。系统发育树显示, G1 与多株 *Chaetomium globosum* 位于同一分支, 其聚类支持强度为 98%; G13 与多株 *Chaetomium* sp. 位于同一分支, 其聚类支持强度为 99%; Y2 与 *Fusarium* sp. (KT268402.1) 位于同一分支, 其聚类支持强度为 99%; Y17 与 *Fusarium solani* (KU528855.1 和 MF800959.1) 位于同一分支, 其聚类支持强度为 97%; D1 与 *Cladosporium ramotenellum* (KX674646.1、KP701983.1、MF473250.1) 位于同一分支, 其聚类支持强度为 98%; Z1 与多株 *Leptosphaeria* sp. 位于同一分支, 其聚类支持强度为 99%; A3 与 *Phoma*

Z1、*Phoma multirostrata* A3 和 *Phoma* sp. A1。

4 讨论

植物内生真菌具有很多不同的种类, 可以通过多种机制调节宿主植物的形态和生理功能, 且几乎存在于所研究的每一种组织类型^[19]中, 被认为是一种很有前途的生物活性物质和植物病原生物防治

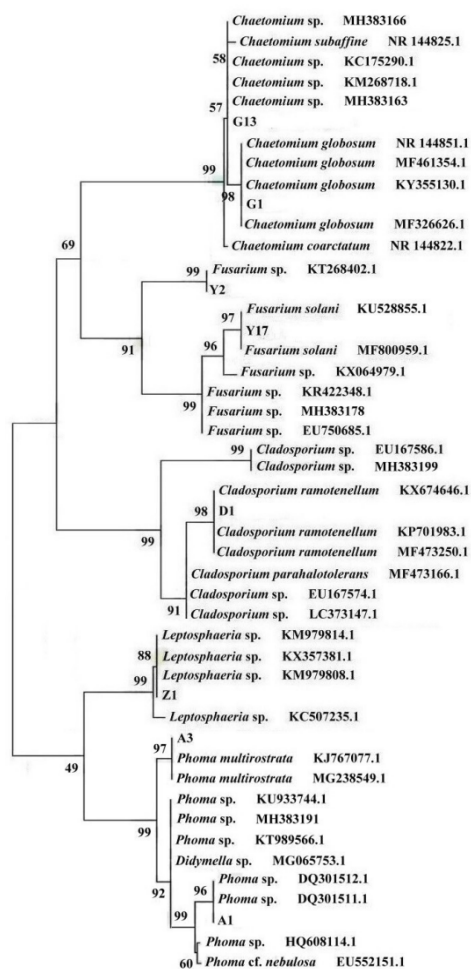


图1 基于ITS基因序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on analysis of ITS sequences

制剂的开发来源。内生真菌仍是研究较少的一类微生物^[13],其复杂的生物资源和生态功能仍有待广泛开发^[20]。叶底珠是一种重要的中药植物,其有效成分在医药、化工等领域受到越来越多的关注,但在内生真菌活性等研究领域却很少有人关注。在本研究中,从叶底珠根、茎、叶中分离得到的59株内生真菌菌株。在叶底珠真菌中,内生真菌不仅数量庞大,而且种类丰富。研究了内生真菌菌株的生物活性,发现菌株G1、G13、Y2、Y17、D1、Z1具有比较好的氧化活性;A1、G1、Y2、D1、G17、Z1具有比较好的抗炎活性;G1、G13、A3、Y2、D1、A1具有比较好的镇痛作用。研究发现,菌株Y2的总黄酮与总酚含量最高,它的抗氧化效果最好;菌株G1的总生物碱含量最高,它的抗炎镇痛效果最好。生物统计分析后发现这些生物活性物质的含量与生物活性有关,总酚含量和抗氧化作用、总生物碱含量和抗炎活性间达到了显著相关。生物碱是存在于生物体中的一类含氮的碱性有机化合物,大多数有复杂的

环状结构,环内氮素多,有显著的生物活性,是中草药中重要的有效成分之一。假蒟提取物发挥抗炎作用的有效物质成分可能是生物碱,包含14个生物碱化合物的苦木总生物碱可以显著降低大鼠血清肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白细胞介素(IL)-6的含量,具有良好的抗炎活性^[21]。

Chaetomium globosum G1具有显著的抗炎镇痛效果,毛霉菌是一种常见的植物内生真菌,它含有多种活性成分,常作为植物病原菌的生物防治真菌。该菌株从传统药用植物白茅 *Imperata cylindrical* 中分离得到的化学成分结构新颖,药理活性显著^[22]。从银杏内生真菌 *C. globosum* 的次生代谢产物中分离并鉴定出 Chaetoglobosin Vb,发现其对多种对农业造成严重危害的病原菌和植物病原菌有较强的抑制作用^[23]。内生真菌 *C. globosum* 的代谢产物可以抑制植物病原体的生长,其抗氧化活性也可以抑制乙酰胆碱酯酶^[24]。

本课题组已有的研究表明从药用植物叶底珠不同的部位分离得到的内生真菌具有一定的组织专一性,其中根部和茎片的内生真菌在数量和种群组成上均较丰富,与叶中的内生真菌存在明显差异^[25]。本研究发现活性菌株的分布也具有一定的组织专一性,实验筛选得到的具有显著抗炎抗氧化活性的内生真菌均分离自根和叶片中,而从茎中分离得到的菌株只有G13筛选出活性。有研究表明,处于生物多样性丰富、生长竞争激烈的环境下的内生真菌产生活性次生代谢产物的可能性较大^[23]。由于叶底珠内生真菌生长在黄河三角洲贝壳堤岛,同时具有特殊生境和内生菌的特点,其代谢产物支持特殊生态系统中真菌的适应和生存,已成为寻找新活性药源的重要资源库。

从真菌系统进化的角度来看,植物与其内生真菌是协同进化的,特定的内生真菌可能在与宿主植物长期协同进化中由于遗传信息的传递获得了宿主植物的特定代谢途径,从而使内生真菌产生与宿主相同或相似的生理活性成分^[2,26]。叶底珠根部入药,其生物碱类化合物含量较高、种类较多^[2-3],主要含有以一叶菝型生物碱为代表的多种抗炎镇痛抗氧化活性物质^[1],研究发现其内生真菌也具有相应的生物活性。从植物内生真菌中获得具有抗菌活性的天然产物不仅可以突破植物资源缺乏、再生周期长等缺陷,而且利用工业化发酵可以实现天然活性化合物大规模、低成本、无污染的生产。内生真菌被认为是天然抗菌化合物的一种新资源,具有高

效、环保的特点。目前,本课题组正在对本研究筛选到的抗炎镇痛抗氧化活性菌株进行次生代谢产物的研究,上述活性菌株是否能够产生一叶萩型生物碱化合物,还有待进一步研究确证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵名君,李俊南,曹森,等.叶底珠抑菌活性内生真菌的筛选及鉴定[J].山东化工,2019,48(6):95-98.
Zhao M, Li J, Cao S, et al. Isolation and identification of endophytic fungi with antimicrobial activity from *Securinega suffruticosa* [J]. Shandong Chem Ind, 2019, 48(6): 95-98.
- [2] Du W, Yao Z G, Li J L, et al. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Securinega suffruticosa* in the Yellow River Delta [J]. PloS One, 2020, 15(3): e0229589.
- [3] Qin S, Liang J Y, Gu Y C, et al. Suffruticosine, a novel octacyclic alkaloid with an unprecedented skeleton from *Securinega suffruticosa* (Pall.) Rehd. [J]. Tetrahedron Lett, 2008, 49(49): 7066-7069.
- [4] Li M D, Han S W, Zhang G, et al. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of *L*-securinine on human breast cancer MCF-7 cells [J]. Die Pharmazie, 2014, 69(3): 217-223.
- [5] Han S, Yang X, Pan Y, et al. *L*-securinine inhibits the proliferation of A549 lung cancer cells and promotes DKK1 promoter methylation [J]. Oncol Lett, 2017, 14(4): 4243-4248.
- [6] 范延辉,王君,王进宾.黄河三角洲贝壳堤放线菌多样性及抑菌活性[J].土壤通报,2016,47(5):1142-1147.
Fan Y, Wang J, Wang J, et al. Diversity and antimicrobial activity of cultured Actinomycetes in seashell islands of Yellow River Delta [J]. Chin J Soil Sci, 2016 (5): 1142-1147.
- [7] Wang F, Zhao W L, Zhang C H, et al. Cytotoxic metabolites from the endophytic fungus *Chaetomium globosum* 7951 [J]. RSC Adv, 2019, 9(28): 16035-16039.
- [8] Chen X X, Luo X L, Fan M M, et al. Endophytic fungi from the branches of *Camellia taliensis* (W. W. Smith) Melchior, a widely distributed wild tea plant [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2019, 35(7): 113.
- [9] Yuan Y, Feng H J, Wang L F, et al. Potential of endophytic fungi isolated from cotton roots for biological control against verticillium wilt disease [J]. PloS One, 2017, 12(1): e0170557.
- [10] Zhu M L, Zhang X M, Feng H M, et al. Campyridones A-D, pyridone alkaloids from a mangrove endophytic fungus *Campylocarpon* sp. HDN13-307 [J]. Tetrahedron, 2016, 72(37): 5679-5683.
- [11] Ren N, Liu J J, Yang D L, et al. Identification of vincamine indole alkaloids producing endophytic fungi isolated from *Nerium indicum*, Apocynaceae [J]. Microbiol Res, 2016, 192: 114-121.
- [12] Teasdale S E, Caradus J R, Johnson L J. Fungal endophyte diversity from tropical forage grass *Brachiaria* [J]. Plant Ecol Divers, 2018, 11(5/6): 611-624.
- [13] Zheng Y K, Miao C P, Chen H H, et al. Endophytic fungi harbored in *Panax notoginseng*: diversity and potential as biological control agents against host plant pathogens of root-rot disease [J]. J Ginseng Res, 2017, 41(3): 353-360.
- [14] 王晓敏,万景瑞,史冠莹,等.一株具 α -糖苷酶抑制活性、抗氧化和抗细菌活性的香椿内生真菌的筛选与鉴定[J].食品与发酵工业,2019,45(16):136-142.
Wang X M, Wan J R, Shi G Y, et al. Screening and identification of an endophytic fungus with α -glucosidase inhibitory, antioxidative and antibacterial activities from *Toona sinensis* [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45(16): 136-142.
- [15] 张启浩,雷雨露,朱晓兰,等.中药竹黄不同提取部位抗炎镇痛活性的研究[J].山东化工,2018,47(16):44-45,52.
Zhang Q, Lei Y, Zhu X, et al. Study on traditional chinese medicine *Shiraia Bambusicola* anti-inflammatory and analgesic activity of different extracts [J]. Shandong Chem Ind, 2018, 47(16): 44-45, 52.
- [16] 倪力军,赵雯雯,马骏,等.基于腰痛宁胶囊的中药有效部位组方抗炎镇痛活性评价与筛选[J].中草药,2016,47(18):3255-3262.
Ni L J, Zhao W W, Ma J, et al. Evaluation and screening of anti-inflammatory and analgesic activities of active fraction prescriptions in Chinese materia medica based on Yaotongning Capsule [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(18): 3255-3262.
- [17] 杨金凤,郭巧生,朱再标,等.不同水分梯度下垂盆草生长发育、品质及抗氧化活性关系研究[J].中草药,2018,49(14):3382-3388.
Yang J F, Guo Q S, Zhu Z B, et al. Relationship sarmentosum among growth, quality, and anti-oxidant activities of *Sedum under* different soil moisture [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(14): 3382-3388.
- [18] 陈川威,周璐丽,王定发,等.假蒺提取物的体外抗氧化和抗炎效果研究[J].中国畜牧兽医,2019,46(3):677-683.
Chen C, Zhou L, Wang D, et al. Study on antioxidant and antiinflammatory effects of extracts from *Piper sarmentosum* Roxb. *in vitro* [J]. China anim husb Veterin

- Med, 2019, 46(3): 677-683.
- [19] Shi Y N, Xie H R, Cao L X, et al. Effects of Cd- and Pb-resistant endophytic fungi on growth and phytoextraction of *Brassica napus* in metal-contaminated soils [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2017, 24(1): 417-426.
- [20] Tejesvi M V, Kajula M, Mattila S, et al. Bioactivity and genetic diversity of endophytic fungi in *Rhododendron tomentosum* Harmaja [J]. *Fungal Divers*, 2011, 47(1): 97-107.
- [21] 刘博文, 刘富垒, 王如意, 等. 苦木总生物碱的化学成分分析及其对大鼠胶原诱导性关节炎的作用 [J]. *中国药科大学学报(英文版)*, 2019, 50(5): 585-592.
- Liu B W, Liu F L, Wang R Y, et al. Chemical constituents of total alkaloids from *Picrasma quassioides* and its effects on collagen induced arthritis in rats [J]. *J China Pharm Univ*, 2019, 50(5): 585-592.
- [22] Ding G, Song Y C, Chen J R, et al. Chaetoglobosin U, a cytochalasan alkaloid from endophytic *Chaetomium globosum* IFB-E019 [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(2): 302-304.
- [23] Xue M, Zhang Q, Gao J M, et al. Chaetoglobosin vb from endophytic *Chaetomium globosum*: absolute configuration of chaetoglobosins [J]. *Chirality*, 2012, 24(8): 668-674.
- [24] Li W, Yang X, Yang Y, et al. Anti-phytopathogen, multi-target acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities of metabolites from endophytic *Chaetomium globosum* [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(22): 2616-2619.
- [25] 王艳红, 朱艳萍, 杨信东, 等. 温郁金抗炎抗氧化活性内生真菌的筛选 [J]. *药物评价研究*, 2013, 36(2): 90-94.
- Wang Y, Zhu Y, Yang X, et al. Screening of endophytic fungi from *Curcuma wenyujin* with anti-inflammatory and anti-oxidant activities [J]. *Drug Eval Res*, 2013, 36(2): 90-94.
- [26] 张海龙. 产黄酮银杏内生菌的分离, 鉴定与发酵条件优化研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- Zhang H L. Study on isolation, identification and fermentative optimization of flavonoids-producing endobhytites from *Ginkgo biloba* L. [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014.

[责任编辑 兰新新]