

51. 2 (CH), 32. 2 (CH, β -Val), 20. 9 (CH₃, γ -C_{Val}), 19. 1 (CH₃, γ -C_{Val}), 17. 1 (CH₃, β -C_{Ala}) 如前所述鉴定为环(丙-缬)。

化合物III: 混合物中的一个组分, C₉H₁₆N₂O₂, FAB-MS m/z 185 ([M+H]⁺)。 ¹H NMR (400 MHz, 氘代吡啶) δ 9. 25 (1H, br. s, NH_{Ala}), 9. 16 (1H, br. s, NH_{Leu}), 4. 34 (1H, ca. , α -H_{Ala}), 4. 27 (1H, m, α -H_{Leu}), 2. 12 (1H, ca. , β -H_{Leu}), 1. 96 (1H, m, β -H_{Leu}), 2. 12 (1H, ca. , γ -H_{Leu}), 1. 66 (3H, d, J= 6. 5 Hz, β -H_{Ala}), 0. 925 (3H, d, J= 6. 0 Hz, δ -H_{Leu}), 0. 919 (3H, d, J= 6. 4 Hz, δ -H_{Leu})。 ¹³C NMR (100 MHz, 氘代吡啶) δ 169. 7 (CO_{Leu}), 169. 6 (CO_{Ala}), 54. 1 (CH, α -C_{Leu}), 51. 4 (CH, α -C_{Ala}), 43. 9 (CH₃, β -C_{Leu}), 24. 7 (CH, γ -C_{Leu}), 23. 4 (CH₃, δ -C_{Leu}), 21. 9 (CH₃, δ -C_{Leu}), 20. 8 (CH₃, β -C_{Ala})。 如前所述鉴定为环(丙-亮)。

化合物IV: 混合物中的另一个组分, C₉H₁₆N₂O₂, FAB-MS m/z 185 ([M+H]⁺)。 ¹H NMR (400 MHz, 氘代吡啶) δ 9. 26 (1H, br. s, NH_{Ala}), 8. 95 (1H, br. s, NH_{Le}), 4. 34 (1H, ca. , α -H_{Ala}), 4. 19 (1H, m, α -H_{Le}), 2. 34 (1H, m, β -H_{Le}), 2. 06 (1H, m, γ -H_{Le}), 1. 74 (1H, m, γ -H_{Le}), 1. 68 (3H, d, J= 6. 5 Hz,

β -H_{Ala}), 1. 14 (3H, d, J= 7. 2 Hz, γ -H_{Le}), 0. 887 (3H, t, J= 7. 5 Hz, δ -H_{Le})。 ¹³C NMR (100 MHz, 氘代吡啶) δ 170. 0 (CO_{Ala}), 167. 8 (CO_{Le}), 60. 4 (CH, α -C_{Le}), 51. 1 (CH, α -C_{Ala}), 39. 2 (CH, β -C_{Le}), 24. 9 (CH₃, γ -C_{Le}), 20. 4 (CH₃, β -C_{Ala}), 15. 6 (CH₃, γ -C_{Le}), 12. 2 (CH₃, δ -C_{Ala})。 如前所述鉴定为环(丙-异亮)。

致谢: 中国科学院昆明植物研究所植物化学开放实验室仪器分析组测定所有光谱, 感谢云南省教委给予科研经费资助。

参考文献

- 1 吴征镒. 新华本草纲要. 第三册. 上海: 上海科技出版社, 1990: 47
- 2 浦相渝, 杨崇仁, 周俊. 云南植物研究, 1984, 6(4): 463
- 3 浦相渝, 周俊. 云南植物研究, 1987, 9(3): 369
- 4 浦相渝, 周俊. 云南植物研究, 1989, 11(2): 198
- 5 Tan N H, Zhou J, Chen C X, et al. Phytochemistry, 1993, 32: 1327
- 6 Zhao Y R, Zhou J, Wang X K, et al. Phytochemistry, 1995, 40: 1453
- 7 Zhao Y R, Zhou J, Wang X K, et al. Chinese Journal of Chemistry, 1995, 13(6): 552
- 8 张荣平, Zou C, He Y N, 等. 云南植物研究, 1997, 19(3): 304
- 9 Wang Y C, Tan N H, Zhou J, et al. Phytochemistry, 1998, 49: 1453
- 10 Ding Z T, Wang Y C, Zhou J et al. Chinese Chemical Letters, 1999, 10: 1037
- 11 Ding Z T, Zhou J, Tan N H, et al. Plant Medica, 2000, 66: 386 (1999-12-06收稿)

长春花内生真菌的分离及其发酵产生药用成分的初步研究[△]

云南大学生物系(昆明 650091) 张玲琪* 郭波 李海燕 曾松荣
 云南省微生物研究所 邵华 谷苏 魏蓉城

摘要 首次报道从长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 茎的韧皮部中分离出尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*, 为该植物的一种内生真菌, 并用 TLC 和 HPLC 对该菌的 97CG₃ 菌株培养物进行了分析, 初步结果表明该真菌能产生抗癌药长春新碱成分。

关键词 长春花 内生真菌 尖孢镰刀菌 长春新碱

Preliminary Study on the Isolation of Endophytic Fungus of *Catharanthus roseus* and Its Fermentation to Produce Products of Therapeutic Value

Department of Biology, Yunnan University (Kunming 650091) Zhang Lingqi, Guo Bo, Li Haiyan and Zeng Songrong
 Yunnan Institute of Microbiology Shao Hua, Gu Su and Wei Rongcheng

Abstract An endophytic fungus, *Fusarium oxysporum*, (97CG₃) was isolated from the phloem (inner bark) of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don for the first time. Metabolic products of cultured 97CG₃ have been analysed by TLC and HPLC. It was shown that the fungus can produce vincristine which has an

* Address: Zhang Lingqi, Biology Department of Yunnan University, Kunming

张玲琪 女, 57岁, 1964年毕业于云南大学。现任生物系教授, 硕士生导师。长期从事基础微生物学及应用微生物学的教学和科研工作, 先后主持和参与国家和省自然科学基金以及有关部门委托的纵向课题 10余项, 在内生真菌、菌根菌以及环保和食品微生物等方面均完成了较多的工作, 获得过部、省级科技进步奖, 已发表有关论文 40余篇, 并合著出版著作 2本。

[△]国家自然科学基金资助项目 (No. 39860005); 云南省应用基础研究基金资助项目 (No. 96C009M)

anticancer activity.

Key words *Catharanthus roseus* (L.) G. Don endophytic fungus *Fusarium oxysporum* vincristine

长春花 *Catharanthus roseus* (L.) Don 为夹竹桃科长春花属多年生草本植物,全草均可药用,有较高药用价值^[1]。五十年代末,发现长春碱和长春新碱具有抗肿瘤活性,尤其对白血病具显著疗效。此后,从长春花不同部位分离出 100 多种生物碱,但这些生物碱在植物体内含量低,且植物生长缓慢,资源短缺,限制了抗癌药物的进一步开发。人们又转而进行植物组培研究^[2,3],但植物组培成本高,生产难度大,有效成分含量低,也未能成功应用于生产^[4]。由于植物真菌对植物某些药效成分的形成有重要影响,甚至会产生和其寄主相同或相似的生理活性成分^[5,6],而且真菌易于培养,可以通过育种手段和控制培养条件等措施来大幅度提高其有效成分的含量,并便于组织工业化生产。故利用微生物生产抗癌成分前景十分广阔。本研究不仅对长春花内生真菌的分离和研究,更拟通过真菌和寄主的特定抗癌成分的对比为以后筛选真菌来生产药物奠定基础。目前,从长春花内生真菌产生长春碱的研究除我们初报过交链孢属 (*Alternaria*) 真菌的工作外^[7],在国内外尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 材料:新鲜长春花(2~3年)来源于云南大理弥渡县、巍山县和西双版纳州。硫酸长春新碱(vincristine sulfate)对照品购自上海华联制药公司和 Sigma 公司。

1.2 培养基^[8]:马铃薯葡萄糖培养基(PDA)、查氏培养基、改良的 MM 培养基。

1.3 内生真菌的分离:按常规无菌操作。取长春花不同部位的叶和茎干,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 3~4 次→0.1%升汞漂洗(10~30 s)→无菌水冲洗 5 次。

将上述处理过的叶片和茎在超净台条件下切割成约 0.5 cm×0.5 cm 的小片(茎取韧皮部),然后将小片种植于 PDA 平板上,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。

为了检查表面消毒是否彻底,做了对照实验。将上述同样条件处理过的茎段不作切割直接种植于 PDA 平皿上,置于相同的条件下培养,结果对照用

的茎段周围无任何菌长出,多次重复均如此,证明所分离到的菌是韧皮部内的,而不是表面的附生菌。

1.4 内生真菌的液体培养:液体培养基为基本培养基(MM),将 1 000 mL 培养液分装在 250 mL 的三角瓶中。用接种钩挑取少许菌丝接种于培养瓶中,置于 27℃ 摇床(100 r/min)培养 3~4 d,待菌丝体长好后进行提取。

1.5 提取方法:发酵液 1 000 mL→碱化(pH=8)→离心(2 500 r/min, 15 min)→沉淀→加 CHCl₃→浓缩→置青霉素小瓶中备用。

1.6 检测方法

1.6.1 TCL 检测硅胶板:自制硅胶板和购自青岛海洋化工厂的硅胶板。展开剂:苯-丙酮=8:2;显色采用碘显色。

1.6.2 液相色谱分析:仪器:BECKMAN 421A 控制器,110B 溶剂导入组件;163 可变波长检测器,427 积分仪。

条件:检测波长 $\lambda=238$ nm,吸光度 0.5;泵 A(重蒸水) 1~1.5×69 Pa;泵 B(甲醇) 1~1.5×69 Pa。

流速:0.5 mL/min;泵 A 30%、泵 B 70%。

2 结果与讨论

2.1 长春花内生真菌 97CG₃ 的形态特征及生长特性:从云南不同地点生长的长春花的茎和叶中分离出 20 多个真菌菌株,其中有一菌株 97CG₃ 的培养物中含有长春新碱成分,该菌株经鉴定为尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* Schlecht (图 1),97CG₃ 在查氏固体平板培养基上菌丝体纤细,白色,通常带有紫色,该菌可产生 2 种类型的分生孢子,大型分生孢子呈纺锤形至镰刀型,多胞无色,小型分生孢子单胞无色呈卵形至椭圆形,并发现有厚垣孢子呈间生和



图 1 97CG₃ 显微镜下分生孢子形态 (992X)

顶生^[9]。在 25℃, 28℃, 32℃ 3个不同的温度炉条件下, 接种量都一致(均为 0.1%), 97CFG₃ 菌株在 28℃ 时, 最终吸光度值高, 生长最好。

2.2 长春花内生真菌 97CG₃ 培养物中长春新碱的测定: 通过不同的展开剂进行薄层层析都发现与对照品硫酸长春新碱相同的斑点(图 2) 但不够理想。为此我们又进一步经 HPLC 检测, 发现内生真菌 97CG₃ 样品在现有设定条件下的保留时间 R_f 值在 2.59 min 时色谱峰与对照品硫酸长春新碱在 2.60 min 时的波峰相同(图 3)。

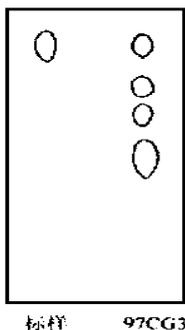


图 2 97CG₃ 产物的 TLC 检测

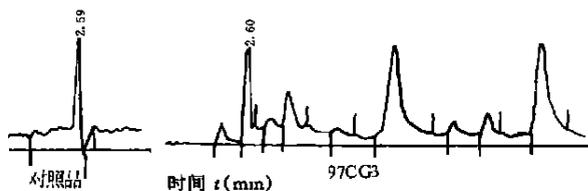


图 3 97CG₃ 产物的 HPLC 检测

2.3 微生物产生与植物一致的次生代谢产物的可能性分析: 生物在次生代谢过程中其生化途径的连续演化会导致有益物质进入到共生体中, 其基本的生化过程信息有时还会传递到其它生物中去, 在生物早期的系统发育过程中, 一些具有完全互补的遗传特性或参与代谢过程的其它生物体(如细菌或蓝藻), 被认为可以组合进真核细胞并发育成线粒体和叶绿体^[10]。

生物之间的相互作用和“协同进化”。“内共生理论”认为, 在共生体内, 一旦次生代谢中出现有用生

化途径, 它就能被其它生物所利用, 表现出相互作用和“协同进化”(co-evolution) 很多真菌激素, 包括有性生殖过程中的一些激素, 其化学结构与哺乳动物中的某些细胞调节机制即是从微生物进化而来^[11, 12]。因此, 用微生物生产与植物相同或类似的次生代谢产物是可行的。

从测定结果看出, 97CG₃ 的液体培养基中含有长春新碱成分, 但合成的该物质含量低。今后, 我们将着手纯化该菌株产生的长春新碱成分, 以便利用质谱和免疫学方法作进一步鉴定, 同时也将积极开展菌株的选育工作。

致谢: 生物系 97 届学生葛再伟、王浩, 微生物研究所张云峰和省工业微生物发酵工程重点实验室刘勇和罗岚芸老师等先后参加过部分工作, 特在此表示谢忱。

参考文献

- 1 中国科学院植物研究所编. 中国高等植物图鉴. 北京: 科学出版社, 1985 430
- 2 Barry V C. Secondary Products from Plant Tissue Culture. Oxford, 1990 224
- 3 Schie O, Berlin J. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1987, 8(2): 153
- 4 郑珍贵, 刘 涤, 胡之壁, 等. 国外医药-植物药分册, 1996, 11(5): 204
- 5 江东福, 马 萍, 张玲琪, 等. 云南植物研究, 1995, 17(1): 79
- 6 Stierle A, Strobel G, Stierle D. Science, 1993, 260(4): 214
- 7 郭 波, 李海燕, 张玲琪. 云南大学学报(自然科学版), 1998, 20(3): 214
- 8 范秀蓉, 李广武, 沈 萍编. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1989 260
- 9 C. 布斯著. 陈其泽译. 镰刀菌属. 北京: 农业出版社, 1998 152
- 10 翟中和主编. 细胞生物学. 北京: 高等教育出版社, 1995 379
- 11 王伯荪, 李鸣光, 彭少麟著. 植物种群学. 广州: 广东高等教育出版社, 1995 294
- 12 Roth J, Leroith V. Annals of the New York Academy of Science, 1986, 436 1

(1999-12-18 收稿)

邮购信息: 手动快速红外试样压片器

适用仪器: 光栅型或傅立叶型红外分光光度计。计有: 上分、天光、日立、岛津、PE 蔡司、尼高力等公司仪器配备。

使用单位: 药检所、制药厂、药物研究所、化工研究所、涂料研究所、药科大学等。

压片器结构及性能比较: 和传统油压机压片模具及手动压片器相比, “手动快速试样压片器”将盐片压制在不锈钢套管内, 使用更方便, 持续速度快, 可连续压 8-10 片, 压片、清洗、抹干、烘干 < 1 分钟/片。

微量 冲头 φ7 mm, 约 20 mg, 按 1% 计, 需试样 0.2 mg 可与 TLC 配合联用。透光率 > 80% (参比盐片), 图谱平直度好。(参比、试样盐片的一致性), 环境湿度 > 80% 时, 在红外灯下烘烤使套管及盐片高于室温 10-20℃ 下扫描。

不抽真空即能符合要求。盐片泛白后可烘烤后重压即可恢复透明。

冲头憎水处理, 不易粘冲, 万一粘冲只要清洗清洁冲头即可。省力, 女士适用。

盐片可保存, 转移或反复使用。还适于成膜性辅料及塑料薄膜制成盐片。

适于液体试样: 空白盐片呈杯状适于单面或双面加液, 对称性好图谱好。适用于半固体或石蜡糊试样(有关文章《手动快速红外试样压片器在药品红外鉴别上的应用》全文见《食品分析》2000 年第三期)。

“手动快速红外试样压片器”现状: 十余年来数次改进, 工艺水平可与舶来品相媲美, 性能已优于进口的 quick press

整套压片装置邮购价贰仟圆整。选购件: φ3 cm 玛瑙研钵 60 元/套, φ5 cm 玛瑙研钵 100 元/套。

经销: 常州佳欣物资有限公司 开户行: 中信实业银行 帐号: 7010182200027813

联系人: 孙国新(213000 常州市麻巷 64 号 电话: 0519-81113019 E-mail: sunguoxin@cn99.com)